

**Funktionale Analyse des ATPase- und des Zn^{2+} -Bindungs-
Motivs der *Bacillus subtilis* Protease FtsH und deren
Einfluss auf die Sporulation**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften
der Universität Bayreuth

vorgelegt von
Matthias Kotschwar
geboren am 14.10.1972 in Wolfsburg

Bayreuth, im April 2004

Die vorliegende Arbeit wurde vom Juli 2000 bis April 2004 am Lehrstuhl für Genetik unter der Leitung von Prof. Dr. Wolfgang Schumann angefertigt.

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften der Universität Bayreuth genehmigten Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. Nat.)

Promotionsgesuch eingereicht am: 28.04.2004

Wissenschaftliches Kolloquium am: 29.06.2004

1. Gutachter: Prof. Dr. W. Schumann

2. Gutachter: Prof. Dr. H. Drake

Amtierender Dekan: Professor Dr. Ortwin Meyer

Für meine Eltern

Danksagung

Mein Dank gilt...

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Schumann für die Überlassung des Themas, sein Interesse am Fortgang meiner Arbeit, sowie der ständigen Diskussionsbereitschaft und der überlassenen Freiräume bei der Arbeit.

Stefan, Thomas und Karin für ihre Hilfsbereitschaft, Ratschläge und Denkanstöße, welche die Arbeit erleichtert haben.

Allen momentanen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Schumann für Hilfsbereitschaft, Verständnis und Spaß im Labor.

insbesondere Simone und Tobias für den guten Zusammenhalt im Ausweichlabor, als wir überbelegt waren.

Andrea, Claudia, Stefanie, Sue und Niklas für eine angenehme Arbeitsatmosphäre, viel Spaß und Gummibärchen.

der Arbeitsgruppe Lehner für gute Zusammenarbeit.

den Kräften, die den Lehrstuhlbetrieb am Laufen halten, den technischen Assistentinnen, Damen in der Spülküche und den Sekretärinnen, dafür, dass sie für einen reibungslosen Ablauf des Lehrstuhllalltags gesorgt haben.

meinen Freunden, insbesondere Maic, Martina, Andre, Stefan und Rüdiger, für Ablenkung und Aufmunterung.

Meiner Familie, vor allem meinen Eltern, für ihre Unterstützung in allen Lebenslagen.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VI
Zusammenfassung	1
Summary	3
1. Einleitung	5
1.1 Proteasen und Chaperone	5
1.2 Die AAA-Proteinfamilie	5
1.2.1 Die AAA ⁺ -Proteinfamilie	6
1.3 Das FtsH-Protein aus <i>E. coli</i>	7
1.3.1 Topologie des FtsH-Proteins aus <i>E. coli</i>	7
1.3.2 Substrate und Funktion des FtsH-Proteins	9
1.4 Das FtsH-Protein aus <i>B. subtilis</i>	10
1.4.1 Funktion des FtsH-Proteins aus <i>B. subtilis</i>	10
1.4.2 Phänotyp einer ftsH-Nullmutante	11
1.4.3 Mögliche Ursachen für die Phänotypen der ftsH-Nullmutante	12
1.5 Der Sporulationszyklus bei <i>B. subtilis</i>	13
1.5.1 Morphologische Veränderungen während der Sporulation	15

1.6	Zielsetzung	16
2	Material und Methoden	18
2.1	Bakterienstämme, Hefestämme, Plasmide, Oligonukleotide und Antikörper	18
2.1.1	Bakterienstämme	18
2.1.2	Plasmide	19
2.1.3	Oligonukleotide	21
2.1.4	Das FtsH-Protein aus <i>B. subtilis</i>	22
2.2	Nährmedien, Puffer und Lösungen	22
2.2.1	Nährmedien	22
2.2.2	Antibiotika-Lösungen	23
2.3	Biochemikalien, Chemikalien, Enzyme, Molekulargewichts-Standards und verwendete Kits	23
2.4	Molekulargenetische Methoden	24
2.4.1	Allgemeine, genetische und biochemische Methoden	24
2.4.2	Sporulationstest	25
2.4.3	Subtilisintest	25
2.4.4	Herstellung und Transformation von kompetenten <i>B. subtilis</i> -Zellen	25
2.4.5	Herstellung und Transformation RbCl-kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	25
2.4.6	Isolierung von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab (Boiling Prep)	25
2.4.7	Isolierung von Plasmid-DNA im mittleren Maßstab (Midi Prep)	25
2.4.8	Isolierung chromosomaler DNA von <i>B. subtilis</i>	25
2.4.9	Reinigung von DANN	26
2.4.10	Ligation von DNA-Fragmenten	26
2.4.11	DNA-Amplifizierung mittels PCR	26
2.4.12	Anlegen von Glycerin-Dauerkulturen	26

2.4.13	Sequenzierung	27
2.5	Arbeiten mit RNA	27
2.5.1	Probenentnahme zur RNA-Präparation	27
2.5.2	Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>B.subtilis</i>	27
2.5.3	Elektrophorese von RNA in Agarose-Gelen und Transfer auf Nylonmembranen	27
2.5.4	Herstellung DIG-markierter RNA-Sonden (Riboprobes)	27
2.5.5	Reinigung von DIG-markierten ssRNA-Sonden mittels Präabsorption	28
2.5.6	Hybridisierung membrangebundener RNA mit DIG-markierten ssRNA- Sonden	28
2.5.7	Nachweis DIG-markierter Nukleinsäuren mittels Chemolumineszenz	28
2.5.8	Entfernung von DIG-markierten ssRNA-Sonden von membrangebundener RNA	28
2.6	Arbeiten mit Proteinen	29
2.6.1	Gewinnung von nativen Zellextrakten aus <i>B. subtilis</i>	29
2.6.2	Gewinnung von denaturierten Gesamtzellextrakten aus <i>B. subtilis</i>	29
2.6.3	Bestimmung der Proteinkonzentration	29
2.6.4	Elektrophorese in diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelen	29
2.6.5	Transfer von Proteinen auf Nitrocellulosemembranen (Western-Blot)	30
2.6.6	Immunologischer Nachweis membrangebundener Proteine	30
2.6.7	Überproduktion, Isolierung und Reinigung von GST-Fusionsproteinen	30
2.6.8	Protease-Test	31
2.6.9	Gelfiltration	32
2.6.10	ATPase-Test	32
2.7	Konstruktion von Plasmiden und Stämmen	34
2.7.1	Konstruktion von Plasmiden	34
2.7.1.1	Konstruktion von pKM01-05	34
2.7.1.2	Konstruktion von pXEH01 und pXEH03	35
2.7.2	Konstruktion von Bakterienstämmen	35
2.7.2.1	Konstruktion von <i>E. coli</i> -Stämmen	35
		III

2.7.2.2	Konstruktion von <i>B. subtilis</i> -Stämmen	36
3	Ergebnisse	37
3.1	Untersuchung des Einflusses von Punktmutationen im ATPase- und Zinkbindungs-Motiv von FtsH	37
3.1.1	Konstruktion der zu untersuchenden Stämme	38
3.1.2	Vergleich der Morphologien während des exponentiellen Wachstums	39
3.1.3	Vergleich der Sporulationsfrequenz der <i>ftsH</i> -Mutanten	42
3.1.4	Wachstumsverhalten der <i>ftsH</i> -Mutanten unter Standardbedingungen	44
3.1.5	Wirkung eines Hitzeschocks auf <i>ftsH</i> -Mutanten	48
3.1.6	Untersuchung des Wachstumsverhaltens der <i>ftsH</i> -Mutanten nach einem osmotischen Schock	51
3.1.7	Untersuchung der Subtilisin-Sekretion der Stämme KM01-05 und KMΔ01-Δ05	55
3.1.8	Untersuchung der ATPase Aktivität der Proteine FtsH01-05	57
3.1.9	Untersuchung der Protease-Aktivität der Proteine FtsH01-05	58
3.2	Sporulation	60
3.2.1	Der Sporulationsprozess von <i>B. subtilis</i> stoppt bei <i>ftsH</i> -Mutanten nicht bei der Bildung von Spo0A	60
3.2.2	Die Sporulation in <i>ftsH</i> -Nullmutanten wird bei der Phosphorylierung von Spo0A unterbrochen	61
3.2.3	Das mutierte Spo0A aus <i>Bacillus subtilis</i> SIKΔ <i>ftsH</i> ist in der Lage, die Gene von <i>abrB</i> , <i>spo0E</i> und <i>sinR</i> in der Art zu regulieren, wie das wildtypische phosphorylierte Spo0A in <i>B. subtilis</i> 1012	64
3.2.4	Die Mutante <i>B. subtilis</i> SIKΔ <i>ftsH</i> ist in der Lage den Sporulationsdefekt einer <i>ftsH</i> -Nullmutante zu kompensieren	66

4	Diskussion	68
4.1	Auswirkung der Punktmutation im Bereich der ATPase-Domäne	70
4.2	Auswirkung der Punktmutation im Bereich der Zink-Bindungsdomäne	70
4.3	Die <i>ftsH</i>-Allele mit den Punktmutationen verhalten sich wie die Knockout-Mutanten	72
4.4	Die <i>ftsH</i>-Allele können den <i>ftsH</i>-Nullmutanten Phänotyp nach Hitze- oder osmotischem Schock nicht supprimieren	73
4.5	Die <i>ftsH</i>-Mutanten verhalten sich auch bei der Synthese von Subtilisin wie eine <i>ftsH</i>-Knockout	74
4.6	Spo0A wird in einer <i>ftsH</i>-Nullmutante gebildet	74
4.7	<i>ftsH</i> ist in die Phosphorylierung von Spo0A involviert	75
4.8	Das <i>spo0A</i>-Allel <i>sad67</i> supprimiert den Phosphorylierungsdefekt von Spo0A in <i>ftsH</i>-Nullmutanten	76
4.9	Ausblick	77
5	Literatur	79

Abkürzungsverzeichnis

A _{xxx}	Absorption bei einer Wellenlänge von XXX nm
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
AD	DNA-Aktivierungsdomäne
ad	adjust
Ap	Ampicillin
Aqua	Wasser
3AT	3-Aminotriazol
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
BD	DNA-Bindungsdomäne
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
bidest.	zweifach destilliert
<i>bla</i>	Gen für die β -Lactamase
bp	Basenpaar(e)
bzw.	beziehungsweise
c	chromosomal
°C	Grad Celsius
ca.	Circa
<i>cat</i>	Gen der Chloramphenicol-Acetyltransferase
Cm	Chloramphenicol
d	desoxy
demin.	demineralisiert
dest.	destilliert
d.h.	dass heisst
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced Chemiluminescence
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EGTA	Ethylenglykol-bis-(β -aminoethylether)-tetraacetat

Em	Erythromycin
<i>et al.</i>	<i>et alteri</i>
EtBr	Ethidiumbromid
etc.	et cetera
EtOH	Ethanol
g	Gramm
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
i.d.R.	in der Regel
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktosid
Kan	Kanamycin-Resistenz
kb	Kilobasen
kDa	Kilo-Dalton
l	Liter
LB	Luria Bertani
LiAc	Lithiumacetat
LMW	Low molecular weight
M	molar
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ M	Mikromolar
MG	Molekulargewicht
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
ng	Nanogramm
NK	Negativkontrolle
nm	Nanometer
OD _{xxx}	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von XXX nm
p	plasmidal
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese

PCR	Polymerase Chain Reaction
PEG	Polyethylenglykol
PK	Positivkontrolle
P _{spac}	IPTG-induzierbarer Promotor
P _{Xyl}	Xylose-induzierbarer Promotor
r	resistent
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
<i>S. c.</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S. coelicolor</i>	<i>Streptomyces coelicolor</i>
SDS	Nariumdodecylsulfat
sec	Sekunde
Sp	Spectomycin
ss	einzelsträngig
t	Zeitpunkt (time)
Tab.	Tabelle
TEMED	N, N, N', N' - Tetramethylethylendiamin
Tet	Tetracyclin
Tris	Tri-(hydroxymethyl)-aminoethan
Triton-X-100	Polyoxymethylenether
Trp	Tryptophan
u.a.	unter anderem
UAS	Upstream activating sequence
ÜN	über Nacht
ÜNK	Übernachtkultur
V	Volt
VE-Wasser	vollentsalztes Wasser
vgl.	vergleiche

Vol.	Volumen
Wt	Wildtyp
w/v	Gewicht / Volumen
YPD	Yeast extract-Peptone-Dextrose
z.B.	zum Beispiel

Aminosäuren sind mit dem international gebräuchlichen Einbuchstabencode und Dreibuchstabencode abgekürzt.

Zusammenfassung

Die membrangebundene, ATP- und Zn^{2+} -abhängige Metalloprotease FtsH ist in *E. coli* bereits gut untersucht. Es handelt sich um ein multifunktionales Protein mit ATPase- und Protease-Aktivität. Dort wurden eine Vielzahl von *E. coli ftsH*-Mutanten mit pleiotropen Phänotypen charakterisiert und die Auswirkung von gezielten Mutationen *in vivo* und *in vitro* analysiert (Akiyama *et al.*, 1994; Akiyama *et al.*, 1996).

Über FtsH aus *B. subtilis* ist hingegen noch wenig bekannt. Bisher wurden erst die Phänotypen einer *ftsH*-Nullmutante und einer Insertionsmutante beschrieben, die zu einem pleiotropen Phänotyp führen. Die Rolle bestimmter Bereiche oder Aminosäuren von FtsH wurden hier nicht untersucht (Deuerling *et al.*, 1995; Deuerling *et al.*, 1997; Lysenko *et al.*, 1997).

In ihrer Diplomarbeit konstruierte Eva Harfst 1999 vier *B. subtilis ftsH*-Allele, indem sie gezielt Aminosäuren in der Walker-A-Box und im Zinkbindungsmotiv austauschte, wie sie bereits für *E. coli* und Hefe FtsH beschrieben wurden. Diese mutierten *ftsH*-Gene und ein wildtypisches zur Kontrolle brachte sie in den pX-Vector ein, wodurch sie unter die Kontrolle eines Xylose-induzierbaren Promotors gestellt wurden.

In der vorliegenden Arbeit wurden die mutierten *ftsH*-Allele in das *B. subtilis*-Chromosom integriert und in einem zweiten Schritt das wildtypische *ftsH* deletiert. Die Phänotypen der so erzeugten Mutanten (sowohl die aus dem ersten Schritt, die noch das wildtypische *ftsH* tragen, als auch die aus dem zweiten Schritt, die nur noch das mutierte Allel tragen) wurden hinsichtlich des filamentösen Wachstums, der Sporulation, der Sensitivität gegenüber Hitzeschock und hyperosmotischen Bedingungen analysiert. Dabei stellte sich heraus, dass die mutierten Allele keinen Einfluss auf den Phänotyp der Stämme haben, die das wildtypische *ftsH* noch tragen, und in den Knockout-Stämmen das wildtypische *ftsH* nicht ersetzen können, also den Phänotyp einer *ftsH*-Nullmutante zeigen.

Des Weiteren sind die mutierten *ftsH*-Allele ebenfalls nicht in der Lage, die Defizienz in der Subtilisin-Sekretion zu kompensieren.

ATPase-Tests zeigten, dass eine Mutation im Walker-A-Motiv die ATPase-Aktivität der beiden betroffenen Proteine ausschaltete.

Protease-Tests ergaben, dass keines der mutierten FtsH-Proteine noch eine Protease-Aktivität aufweist. Das bedeutet, dass einerseits die Basenaustausche im Zinkbindungsmotiv die Protease-Aktivität ausschalten, andererseits aber auch keine Protease-Aktivität ohne ATPase-

Aktivität möglich ist. Daraus folgt weiterhin, dass die ATPase-Aktivität des FtsH-Proteins allein nicht ausreicht, um einen der untersuchten pleiotropen Phänotypen einer *ftsH*-Mutante zu kompensieren. Die Funktionalität sowohl der ATPase- als auch der Protease-Domäne ist also für FtsH und somit für *B. subtilis* hinsichtlich des filamentösen Wachstums, der Sporulation, der Sensitivität gegenüber Hitzeschock und hyperosmotischen Bedingungen essentiell.

Anhand von Northern-Blot-Hybridisierungsexperimenten konnte gezeigt werden, dass FtsH eine essentielle Rolle bei der Phosphorylierung von Spo0A haben muss, da ohne FtsH kein aktives Spo0A gebildet wird. Die daraus resultierende Sporulationsdefizienz kann aber durch eine Spo0A-Mutante, die ohne Phosphorylierung aktiv ist, fast vollständig kompensiert werden. FtsH ist also während der Sporulation nur für die Phosphorylierung von Spo0A essentiell.

Summary

In *E. coli* the membrane bound, ATP- and Zn^{2+} -dependent metalloprotease FtsH is already well known. It is a multifunctional Protein with ATP- and protease-activity. A multitude of *ftsH*-mutants with a pleiotropic phenotype have been characterized in *E. coli* and the results of precise point-mutations have been analysed *in vitro* and *in vivo* (Akiyama *et al.*, 1996).

There is little known about FtsH in *B. subtilis*. Just the phenotypes of a *ftsH*-knockout and an insertion-mutant have been described until now, that lead to a pleiotropic phenotype. The role of special regions or amino acids of FtsH have not been examined yet (Deuerling *et al.*, 1995; Deuerling *et al.*, 1997; Lysenko *et al.*, 1997).

In 1999 Eva Harfst constructed four *B. subtilis ftsH*-alleles during her diploma work, by specific exchanges of amino acids in the Walker-A-box and the Zinc-binding-motive, which have been already described for FtsH of yeast and *E. coli*. She cloned these mutated *ftsH*-genes and one wild type allele into the pX-vector and brought them under the control of a xylose inducible promoter.

In this work the mutated *ftsH*-alleles were integrated into the chromosome of *B. subtilis* and in a second step the wildtype *ftsH* was deleted. The phenotypes of these mutants (those which were carrying also the wildtype and the mutated *ftsH*-gene and those which had just the mutated gene) have been analysed for filamentous growth, sporulation and sensitivity against heat-shock hyperosmotic stress. The mutated alleles had no influence on those strains which were also carrying the wildtype *ftsH* and complement those without, showing the phenotype of an *ftsH*-knockout.

Further the mutated *ftsH*-alleles can not compensate the Subtilisin-secretion deficiency.

ATPase-tests are showing, that a the mutation within the Walker-A-motive disables the ATPase-activity of both proteins, carrying these mutation.

Protease-tests were showing, that none of the mutated FtsH-proteins had any protease-activity anymore. So the base-exchange within the Zinc-binding-motive disables the protease-activity as the lack of ATPase-activity does. Therefore the ATPase-activity is not enough to compensate the phenotype of a *ftsH*-knockout. The functionality of both, the ATPase- and the protease-domain are essential for growth behaviour, sporulation and sensitivity against heat-shock and hyperosmotic-stress.

Northern-blot-experiments revealed, that FtsH should have an essential role in the phosphorylation of Spo0A, because no active Spo0A is build in absence of FtsH. The

resulting sporulation-deficiency can be compensated nearly totally by an Spo0A-mutant, which is in an active state even without phosphorylation. So it seems FtsH is mainly just responsible for the phosphorylation of Spo0A.

1. Einleitung

1.1 Proteasen und Chaperone

Unter physiologischen Bedingungen sind Bakterienzellen häufig Stresssituationen, wie der Akkumulation denaturierter, funktionsunfähiger Proteine, ausgesetzt. Um diese bewältigen zu können, haben alle Lebewesen Systeme entwickelt, die ihnen erlauben, den Stress zu beseitigen. Die Proteasen sorgen immer für den Abbau irreversibel geschädigter Moleküle, während Chaperone einerseits in der Lage sind, falsch gefaltete Proteine in die korrekte Konformation zu überführen (Ogura und Wilkinson, 2001) und andererseits auch an deren Proteolyse beteiligt sein können. Sie bewirken also durch die ATP-Hydrolyse die vollständige Entfaltung und geben sie in diesem zugänglichem Zustand an die zuständige Protease weiter (Larsen und Finley, 1997). Ob es zur Rückfaltung in die native Konformation oder zur Proteolyse kommt, hängt vom Denaturierungsgrad des Proteinsubstrats und von der Affinität zum jeweiligen Chaperon ab (Wickner *et al.*, 1991; Suzuki *et al.*, 1997). Ein Beispiel für das Zusammenspiel von Chaperonen und Proteasen sind die Mitglieder der AAA-Familie (Ogura und Wilkinson, 2001).

1.2 Die AAA-Proteinfamilie

Zur (Super-) Familie der AAA-Proteine (ATPases associated with a variety of cellular activities; Kunau *et al.*, 1993) gehören eine Vielzahl pro- und eukaryotischer Proteine. Sie sind an so unterschiedlichen Prozessen wie der Zellzykluskontrolle, der Regulation der Transkription und des Membranzusammenbaus, der Sporulation, der Proteindegradation, dem Vesikeltransport, bis hin zum Proteintransport durch die Membran beteiligt (Confalonieri und Duguet, 1995; Neuwald *et al.*, 1999). Ein charakteristisches Merkmal für die Mitglieder dieser Gruppe ist die sogenannte AAA-Kassette. Dieses 200-250 Aminosäuren lange Modul ist hochkonserviert und kann in einfacher oder duplizierter Form vorhanden sein (Ogura und Wilkinson, 2001) und beinhaltet zwei ATP-Bindungs-Konsensussequenzen (Walker A und Walker B Motiv). Dieses Nukleotidbindungs-Motiv weist die AAA-Proteine als Unterfamilie der großen Gruppe der Walker A/GTPasen aus. Ebenfalls charakteristisch für die AAA-Kassette ist eine homologe Region SRH (second region of homology), welcher eine wichtige Rolle bei der Hydrolyse des ATP zugesprochen wird (Karata *et al.*, 1999).

FtsH wird innerhalb der AAA-Proteinfamilie zu den metallabhängigen AAA-Proteasen gezählt, da es zusätzlich ein konserviertes Zinkbindungs-Motiv enthält. Im Gegensatz zu den meisten AAA-Proteasen, die lösliche Bestandteile des Cytoplasmas sind, handelt es sich bei den Metalloproteasen um integrale Membranproteine.

1.2.1 Die AAA⁺-Proteinfamilie

Im Zusammenhang mit Proteinen, die Protein-DNA-Komplexe aufbauen, wurde der Begriff "molecular matchmaker" geprägt (Sancar und Hearst, 1993). Nach Neuwald *et al.* (1999) ist die AAA⁺-Proteinfamilie eine Erweiterung der AAA-Familie um diese "molecular matchmaker" und weiterer Proteine mit Chaperon- oder chaperonähnlicher Funktion. Die AAA⁺-Proteine haben mit den AAA-Proteinen das Walker-A- und Walker-B-Motiv gemeinsam, ihnen fehlt jedoch die Homologie zur SRH der AAA-Proteine.

Die Mitglieder der AAA⁺-Proteine üben in der Zelle ähnliche Funktionen aus wie die AAA-Proteine, sind aber zusätzlich an DNA-Replikation, Rekombination, Reparatur und der Transkription beteiligt (Ogura und Wilkinson, 2001). Abbildung 1 zeigt eine Auswahl an AAA- und AAA⁺-Proteinen und ihre Funktion in der eukaryotischen Zelle. Prokaryotische Mitglieder sind ebenfalls enthalten.

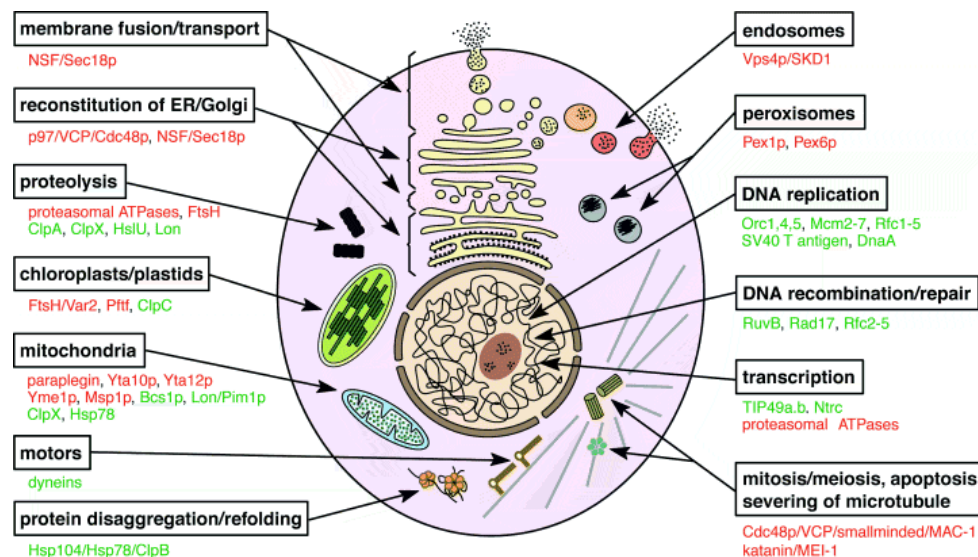


Abb. 1: Die vielfältigen Funktionen der AAA⁺-Proteine in einer Zelle. Es ist eine eukaryotische Zelle mit Organellen und makromolekularen Strukturen schematisch abgebildet. Die subzelluläre Lokalisation der AAA⁺-Proteine und die Prozesse, an denen sie beteiligt sind, sind angegeben. Prokaryotische AAA⁺-Proteine sind ebenfalls aufgeführt. Die Mitglieder der AAA-Proteine sind rot, die der AAA⁺-Proteine grün hervorgehoben (Ogura und Wilkinson, 2001).

1.3 Das FtsH-Protein aus *E. coli*

Der Name „FtsH“ (filamentation temperature sensitive) leitet sich vom Wachstumsverhalten der *E. coli* Mutante Y16 ab, die Santos und Almeida 1975 bei der Suche nach temperatursensitiven Mutanten fanden. Es handelt sich hierbei um einen Segregationsdefekt, der zu filamentösem Wachstum führt. Später stellte sich heraus, dass der Wachstumsdefekt durch eine zusätzliche Mutation im für das Penicillin-Bindeprotein 3 kodierenden Gen *ftsI* hervorgerufen wurde und nicht, wie ursprünglich angenommen, durch die zwei Basensubstitutionen im *ftsH*-Gen (Begg *et al.*, 1992). Erstmals wurde das *ftsH*-Gen durch Belford und Wulf 1974 beschrieben, als sie die Entscheidung zwischen Lyse und Lysogenie bei *E. coli* nach Infektion mit dem Bakteriophagen λ untersuchten. Einige Mutanten wiesen eine erhöhte Lysogenie-Rate auf, und es konnten zwei dafür verantwortliche Genloci identifiziert werden, *hflA* und *hflB* (high frequency of lysogenisation), wobei *hflB* mit *ftsH* identisch ist (Herman *et al.*, 1993; Schumann, 1999). In der Folge bekam FtsH in *E. coli* noch zwei weitere Namen, die ebenfalls jeweils auf zwei seiner Eigenschaften zurückführten, *tolZ* (colicin tolerance) (Matsuzawa *et al.*, 1984) und *mrsC* (m-RNA stability) (Granger *et al.*, 1998).

1.3.1 Topologie des FtsH-Proteins aus *E. coli*

Nachdem 1991 die Nukleotidsequenz des *ftsH*-Gens von *E. coli* bestimmt wurde, konnte daraus ein topologisches Modell des FtsH-Proteins erstellt werden, wie in Abbildung 2 zu sehen (Ogura *et al.*, 1991). Das Protein besteht aus 644 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 70,7 kDa. N-terminal befinden sich zwei Transmembranhelices (TM1 und TM2), durch die das Protein in der Membran verankert ist. Zwischen den Helices befinden sich 71 Aminosäuren, die in den periplasmatischen Raum ragen. Der N-Terminus (3 AS) und der C-Terminus (514 AS) befinden sich hingegen im Cytoplasma. Innerhalb des großen cytoplasmatischen Bereichs befinden sich die AAA-Domäne mit Walker A, Walker B, SRH sowie ein Zinkbindungsmotiv HEAGH (AS 69-73), das Ähnlichkeit zur Sequenz HEXXH der aktiven Zentren von Zink-Metalloproteasen aufweist (Tomoyasu *et al.*, 1993; Herman *et al.*, 1995). Bei der Hydrolyse einer Peptidbindung kommt es zur nukleophilen Aktivierung eines H₂O-Moleküls mit Hilfe des dreifach koordinierten Zn²⁺-Ions (Streier, 1995). An den Walker A- und B-Boxen findet die ATP-Hydrolyse statt, was eine Konformationsänderung bewirkt (Akiyama *et al.*, 1996 und 1998). Des weiteren hat eine C-

terminal gelegene Coiled-Coil-Domäne eine große Bedeutung für die Aktivität von FtsH (Shotland *et al.*, 2000).

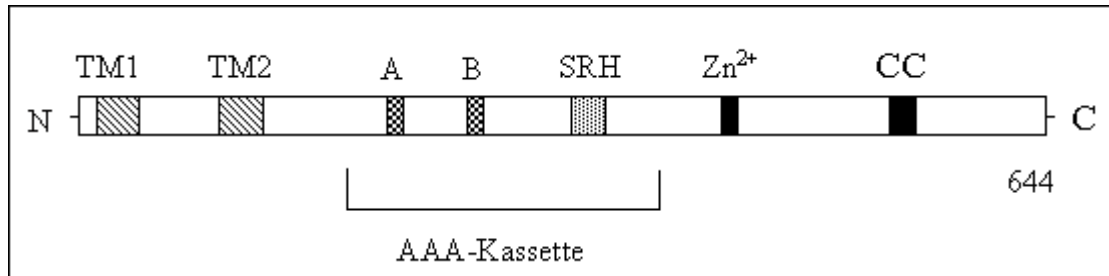


Abb. 2: Domänenstruktur des *E. coli* FtsH-Proteins.

N: N-Terminus; C: C-Terminus. TM: Transmembrandomäne; A: Walker-A-Box; B: Walker-B-Box; SRH: second region of homology; Zn^{2+} : Zinkbindungsmotiv; CC: Coiled-Coil-Region. Der Bereich der AAA-Domäne ist unterhalb des Schemas des 644 AS-Proteins eingezeichnet (Schumann, 1999; modifiziert nach: Shotland *et al.*, 2000).

Verschiedene Strukturanalysen zeigen, dass FtsH eine Ringstruktur aus sechs Untereinheiten mit einem zentralen Hohlraum bildet (Abb. 3) (Niwa *et al.*, 2002), wie sie auch für viele prokaryotische Proteasen und das eukaryotische Proteasom angenommen wird (Shotland *et al.*, 1997). Die Untereinheiten interagieren über die Transmembran-Domänen, FtsH kann aber auch mit anderen Membranproteinen wechselwirken (Abb. 4) (Akiyama, 1995 und 1998).

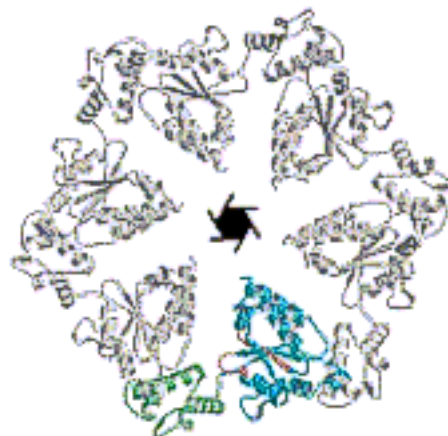


Abb. 3: Postulierte Struktur des FtsH-Hexamers

Dargestellt ist die ringförmige Struktur von sechs FtsH-Untereinheiten aus *Thermus thermophilus*, welche miteinander wechselwirken. Hervorgehoben in blau und grün ist die Struktur eines FtsH-Monomers. In der Mitte befindet sich das proteolytische Zentrum, welches über eine zentrale Pore zugänglich ist (Niwa *et al.*, 2002).

Untereinheit der Proteintranslokase (Kihara *et al.*, 1995) und YccA, ein Protein unbekannter Funktion (Akiyama *et al.*, 1996a). YccA kann sowohl mit FtsH als auch mit HflCK assoziieren, ist jedoch gleichzeitig ein Substrat für FtsH. Beim Abbau von unkomplexiertem SecY wirkt HflCK als negativer Regulator für die Proteaseaktivität von FtsH, nicht aber beim cytosolisch lokalisiertem λ -CII-Protein, was auf eine spezifische, nur gegen Membranproteine gerichtete Regulation durch HflCK hindeutet (Kihara *et al.*, 1998).

Weiterhin ist FtsH regulatorisch an der Synthese von Membran-Hauptkomponenten beteiligt. Es baut die UDP-3-O-(R-3-Hydroxymyristoyl)-N-Acetylglucosamin-Deacetylase ab, welche die Lipid-A-Biosynthese katalysiert. Deren Menge steigt stark an, wenn FtsH fehlt, und es kommt zur Überproduktion der Lipid-A-Polysaccharide. Diese wiederum führt zu anormalen Membranstrukturen, die für die Zelle letal sind. In *E. coli* sind *ftsH*-Nullmutanten daher nicht lebensfähig (Young *et al.*, 1995; Ogura *et al.*, 1999). Es wurde allerdings eine lebensfähige Suppressormutante *sfhC21* (supressor for *ftsH*) konstruiert, in der die R3-Hydroxyacyl-ACP-Dehydrase, ein Enzym der Fettsäure-Biosynthese, überexprimiert wird. Dadurch wird die Synthese von Phospholipiden erhöht und somit die hohe Rate an UDP-3-O-(R-3-Hydroxymyristoyl)-N-Acetylglucosamin-Deacetylase kompensiert (Ogura *et al.*, 1999).

1.4 Das FtsH-Protein aus *B. subtilis*

In *B. subtilis* wurde das FtsH-Protein zuerst 1993 in Bayreuth identifiziert (Geissler und Schumann, 1993). Die Sequenz wurde im Rahmen des *Bacillus*-Genom-Sequenzierungsprojektes ermittelt (Ogasawara *et al.*, 1994). Es hat eine Länge von 637 AS und besitzt eine molare Masse von 70,9 kDa, bei einer Sequenzhomologie von 70 % gegenüber FtsH aus *E. coli* (Deuerling *et al.*, 1997), weshalb das für *E. coli* angenommene Strukturmodell auf *B. subtilis* übertragen wurde. Ein gravierender Unterschied zu *E. coli* ist allerdings, dass FtsH in *B. subtilis* nicht essentiell ist (Purucker, 1996), was wahrscheinlich daran liegt, dass bei Gram-positiven Bakterien keine Lipopolysaccharide vorkommen (Deuerling *et al.*, 1997).

1.4.1 Funktion des FtsH-Proteins aus *B. subtilis*

FtsH gehört zur Gruppe der allgemeinen Stressproteine. Nach hyperosmotischem- oder Hitzeschock steigt die Transkriptionsrate um etwa das Dreifache an (Deuerling *et al.*, 1997), während oxidativer Stress keine vergleichbare Wirkung zeigt (Purucker *et al.*, 1996).

Festgestellt werden konnte auch noch die Lokalisation von FtsH in *B. subtilis* mit Hilfe eines FtsH-GFP⁺-Fusionsproteins. In vegetativ wachsenden Zellen ist eine Anhäufung in der Membran, insbesondere beim Membranaufbau, und bei der Sporulation im Bereich der Vorspore zu beobachten (Wehrl, 1999). Ein spezifischer Inhibitor für FtsH könnte SpoVM sein, bei dem es sich um ein für die Sporulation essentielles 3 kDa Protein aus *B. subtilis* handelt (Prajapati *et al.*, 2000). Genauere Untersuchungen dazu müssen allerdings noch durchgeführt werden. Ansonsten ist über FtsH aus *B. subtilis* noch wenig bekannt. So konnten bisher keine sicheren Substratproteine identifiziert werden. Auch sind keine Interaktionspartner wie in *E. coli* bekannt. HflCK oder Homologe konnten in *B. subtilis* nicht entdeckt werden, obwohl in einem nahen Verwandten, *Bacillus halodurans*, *hflCK* in unmittelbarer Nachbarschaft von *ftsH* auf dem Chromosom liegen. Für YccA wurde zwar das Homolog JetJ gefunden (Kunst *et al.*, 1997), aber eine Interaktion oder Substratfunktion wurde bisher nicht beobachtet (Wehrl, 1999). Weiter Schlüsse auf die Funktion von FtsH in *B. subtilis* lassen sich aus Untersuchungen der Nullmutante ziehen.

1.4.2 Phänotyp einer *ftsH*-Nullmutante

Es wurde bereits beobachtet, dass FtsH in *B. subtilis* unter Hitze- oder Salzschock Bedingungen (37°C → 52°C, bzw. 1,2 M NaCl) verstärkt transkribiert wird. Wird eine *ftsH*-Nullmutante diesen Bedingungen ausgesetzt, so stellt sie ihr Wachstum ein (Deuerling *et al.*, 1997). Ebenso ist die Mutante nicht in der Lage anaerob zu wachsen (Nakano *et al.*, 1997) und das aerobe Wachstum ist filamentös (Lysenko *et al.*, 1997).

Beim Eintritt in die stationäre Phase entwickelt *B. subtilis* eine natürliche Kompetenz, die beim Wildtyp ca. 10% beträgt. Die Nullmutante weist hingegen eine deutlich geringere Kompetenz auf, was sich in einer stark erniedrigten Transformationseffizienz widerspiegelt (Jekle, 1996). Ebenfalls zu diesem Zeitpunkt beginnt der Wildtyp verstärkt mit der Sekretion von etwa 20 Exoproteinen, wie z.B. Subtilisin. In der Nullmutante ist diese stark reduziert, FtsH scheint also in diesen Prozess involviert zu sein (Deuerling *et al.*, 1997). Zudem hat der Wildtyp jetzt die Möglichkeit zu sporulieren (Hoch, 1993), die *ftsH*-Nullmutante dagegen ist Sporulations-defizient und beginnt stattdessen in der stationären Phase zu lysieren (Deuerling *et al.*, 1997; Lysenko *et al.*, 1997). Untersuchungen an *ftsH*-Mutanten weisen darauf hin, dass FtsH bereits in einem sehr frühen Stadium der Sporulation benötigt wird (Deuerling *et al.*, 1997).

1.4.3 Mögliche Ursachen für die Phänotypen der *ftsH*-Nullmutante

Für das filamentöse Wachstum scheint das in *ftsH*-Nullmutanten auftretende veränderte Expressionsmuster der an der Reifung des Peptidoglycans beteiligten Penicillin-Bindeproteine (Pbps) mit verantwortlich zu sein (Lysenko *et al.*, 1997), denn dieser Phänotyp verschwindet in einer *ftsH pbpE* Doppel-Knockout (Zellmeier, 2001).

Die meisten anderen Phänotypen können damit in Verbindung gebracht werden, dass in *ftsH*-Nullmutanten gar kein oder kein aktives Spo0A gebildet wird (Deuerling *et al.*, 1997). Wie in Abbildung 5 zu sehen, wird dieses Regulator-Protein im Zuge der sogenannten Phosphorelay-Kaskade phosphoryliert und somit in den aktiven Zustand überführt.

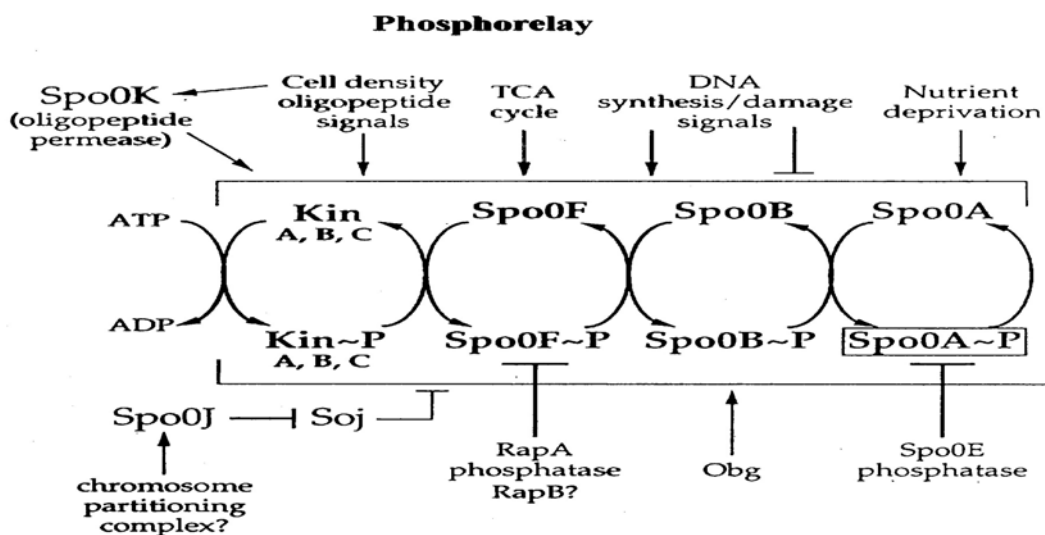


Abb. 5: Phosphorelay-Kaskade von Spo0A

Die Kinasen KinA, B, und C werden durch ATP phosphoryliert und übertragen den Phosphatrest auf Spo0F von dem er an Spo0B weitergegeben wird, bevor dieses ihn schließlich auf Spo0A überträgt und es damit in den aktiven Zustand überführt. Die lange Übertragungskette erlaubt viele regulatorische Eingriffe, wie in der Abbildung dargestellt (Grossman, 1995).

Phosphoryliertes Spo0A hat einen großen Einfluss auf den Zellzyklus, vor allem in Bezug auf die Sporulation (Deuerling *et al.*, 1997), da es die Expression zahlreicher Gene (viele Sporulationsgene) positiv oder negativ reguliert, wie in Abbildung 6 zu erkennen ist.

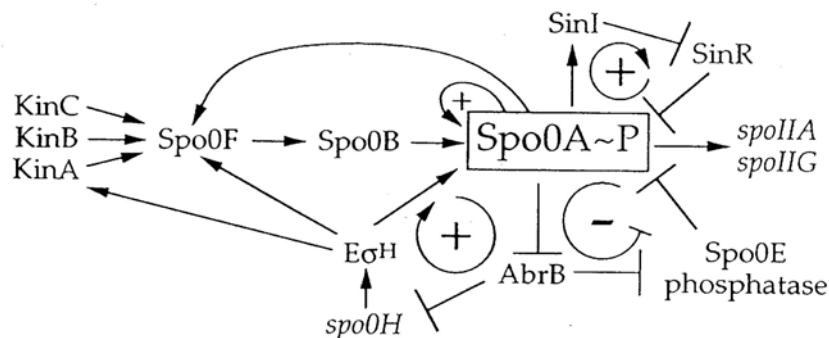
positive und negative Regulation von *spo0A*

Abb. 6: Positive und negative Regulation von *spo0A*

Spo0A wirkt positiv regulierend auf sich selbst, Spo0F, SinI, SpoIIA und SpoIIG, während es negativ regulierend auf AbrB wirkt (Grossman, 1995).

Wenn kein aktives Spo0A gebildet wird, so hat das negative Auswirkungen auf die Osmotoleranz und die Sporulation, während die Expression von *abrB* verstärkt wird. AbrB wiederum inhibiert die Synthese von Subtilisin und die Ausbildung der natürlichen Kompetenz (Wittmann, 1999; Schumann, 1999). FtsH scheint für die Sporulation aber nicht nur in Bezug auf die Bildung von aktivem Spo0A wichtig zu sein, sondern es wird wohl auch noch in späteren Stadien der Sporulation gebraucht (Wittmann, 1999; Cutting *et al.*, 1997).

1.5 Der Sporulationszyklus bei *B. subtilis*

Für den Fall, dass die Wachstumsbedingungen ungünstig werden, sei es durch Nährstoffmangel oder sonstige Umwelteinflüsse, ist *B. subtilis* in der Lage, Endosporen zu bilden, die sehr hitze-, strahlungs- und chemotolerant sind und lange überdauern können (Hoch, 1995). Der Sporulationsprozess von *B. subtilis* wird in sieben, durch römische Ziffern gekennzeichnete, Phasen eingeteilt, wie in Abbildung 7 dargestellt wird. Die Einteilung wurde an Hand der morphologischen und differenziell voneinander trennbaren Phasen vorgenommen. Phase 0 (T_0) kennzeichnet den Eintritt in die stationäre Phase und somit den Beginn der Sporulation. Die weiteren Phasen können auch mit T_1 , T_2 , T_3 usw. bezeichnet werden ($T_n - n$ = Stunden nach Eintritt in die stationäre Phase). Unter Laborbedingungen dauert der Sporulationsprozess normalerweise sechs bis acht Stunden, wobei die Entwicklungsstadien der Zeit in Stunden nach Eintritt in die stationäre Phase entsprechen. Phase II entspricht also T_2 (Harwood, 1989).

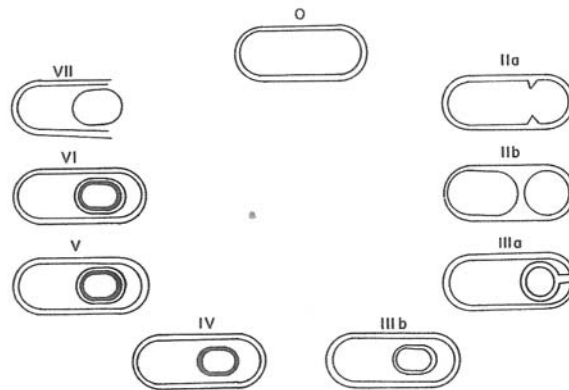


Abb. 7: Schematische Darstellung des Sporulationszyklus in *B. subtilis*

Die Sporulation beginnt zum Zeitpunkt T_0 mit Eintritt in die stationäre Phase (Phase 0). Entsprechend der Darstellung verläuft die Entwicklung im Uhrzeigersinn und endet mit der Phase VII, die gebildete Endospore wird entlassen (Harwood, 1989).

Das Signal zur Initiation der Sporulation kann von unterschiedlicher Natur sein. Fehlende Nährstoffe, zu hohe Zelldichte oder auch DNA-Schäden sind ein Auslöser für diesen Entwicklungszyklus. Entscheidend aber ist der intrazelluläre Spiegel an GTP und GDP (Stragier und Losick, 1996; Lopez *et al.*, 1981). Das Schlüsselprotein der Sporulation ist Spo0A, welches im Zuge der „Phosphorelay-Kaskade“ an einem Aspartat-Rest phosphoryliert wird. Das Phosphat stammt hierbei vom Spo0F-Protein, dem ersten Regulator-Molekül der Kaskade. Spo0A zählt somit zu den Regulatorproteinen eines Zwei-Komponenten-Systems (Krauss, 1997). Seine eigene Expression reguliert es bis zu einer bestimmten Konzentration positiv, danach negativ. Es entsteht ein starker Konzentrationsgradient (Strauch, 1993; Hoch, 1993 und 1995). Unter den von Spo0A negativ regulierten Genen befindet sich auch das für AbrB, welches als Repressor verschiedener Gene fungiert, um eine vorzeitige Sporulation zu unterbinden. Der zweite Hauptregulator der Sporulation ist σ^H (Healy *et al.*, 1991). Seine Hauptaufgabe in der frühen Phase der Sporulation besteht in der Transkription von einem der beiden Promotoren von *spo0A* aus. Der zweite Promotor wird während der vegetativen Phase von σ^A aus exprimiert, um die Anwesenheit des Regulators Spo0A in diesem Stadium für den Signalempfang sicherzustellen (Asai *et al.*, 1995). Im weiteren Verlauf regeln sich selbst und gegenseitig aktivierende Sigmafaktoren den korrekten Ablauf der Sporulation (Perego, 1997).

1.5.1 Morphologische Veränderungen während der Sporulation

In Phase 0 finden keine nennenswerten morphologischen Veränderungen statt, und die Zelle gleicht einer vegetativen Zelle. Eine Phase I wird nicht benötigt, um morphologische Veränderungen zu definieren, deshalb treten die Zellen gleich in Phase II ein (siehe Abbildung 4). Phase II wird als das erste Sporulationsstadium bezeichnet, indem Veränderungen der Zelle sichtbar sind. Sie wird charakterisiert durch die Bildung eines Septums, welches die Zelle in zwei asymmetrische Kompartimente unterteilt, die größere Mutterzelle und die kleinere Vorspore. In Phase III umwächst die Mutterzelle die Vorspore, ein Prozess, der als „Engulfment“ bezeichnet wird. Die Vorspore, welche sich nun im Cytoplasma der Mutterzelle befindet, hat eine doppelte Membranstruktur. Die äußere Vorsporenmembran besitzt dabei umgekehrte Polarität zur inneren Membran. An diesem Punkt ist die Sporulation nicht mehr umkehrbar. In Phase IV wird dann die „Keim-Zellwand“ im Intermembranraum um die Sporenhülle gebildet, der sogenannte Cortex. Während der Phasen V und VI werden die inneren und äußeren Mantelproteine eingelagert.

Durch diesen Prozess wird die Spore resistent gegen Hitze, Chemikalien und Strahlung. Phase VII beendet den Sporulationsprozess mit der Entlassung der fertigen Endospore. Diese kann später unter günstigen Wachstumsbedingungen zu einer vegetativen Zelle auskeimen und später selbst sporulieren (Harwood, 1989; Stragier und Losick, 1996).

1.6 Zielsetzung

Die membrangebundene, ATP- und Zn^{2+} -abhängige Metalloprotease FtsH ist in *E. coli* bereits gut untersucht. Dort wurden eine Vielzahl von *E. coli ftsH*-Mutanten mit pleiotropem Phänotyp charakterisiert und die Auswirkungen von gezielten Mutationen *in vivo* und *in vitro* analysiert (Akiyama *et al.*, 1994; Akiyama *et al.*, 1996). Unter anderem wurde im konservierten Bereich der Walker-A-Box des *E. coli* FtsH ein Lysinrest gegen einen Asparaginrest ausgetauscht, was zum Verlust der ATPase-Aktivität führte (Akiyama *et al.*, 1996a). Des weiteren wurde in den *ftsH*-Homologen aus Hefe YTA10 und YTA12 im konservierten Zinkbindungsmotiv der Glutamatrest durch einen Glutaminrest ersetzt, wodurch die Proteaseaktivität verloren ging (Arlt *et al.*, 1996).

Über FtsH aus *B. subtilis* ist hingegen noch wenig bekannt. Bisher wurden erst die Phänotypen einer *ftsH*- Nullmutante und einer Insertionsmutante beschrieben, die Rolle bestimmter Bereiche oder Aminosäuren von FtsH wurden hier nicht untersucht (Deuerling *et al.*, 1995; Deuerling *et al.*, 1997; Lysenko *et al.*, 1997).

In ihrer Diplomarbeit konstruierte Eva Harfst 1999 vier *B. subtilis ftsH*-Allele, indem sie gezielt Aminosäuren in der Walker-A-Box und im Zinkbindungsmotiv austauschte, wie sie bereits für *E. coli* und Hefe FtsH beschrieben wurden. Diese mutierten *ftsH*-Gene und ein wildtypisches zur Kontrolle brachte sie in den pX-Vector ein, wodurch sie unter die Kontrolle eines Xylose-induzierbaren Promotors gestellt wurden und sich zwischen einer *amyE*-Front- und einer *amyE*-Backside befanden, um so eine Integration in das *B. subtilis*-Chromosom über ein Doppelcrossover am *amyE*-Gen zu ermöglichen.

In der vorliegenden Arbeit sollte geklärt werden, ob für die verschiedenen Funktionen des FtsH-Proteins von *B. subtilis* sowohl die Protease- als auch die ATPase-Aktivität essentiell sind, oder ob gewisse Phänotypen der *ftsH*-Nullmutante spezifisch mit dem Verlust der einen oder anderen Aktivität zusammenhängen. Weiterhin sollte untersucht werden, in welcher Phase bei welchem Schritt die Sporulation in *ftsH*-Nullmutanten abbricht und FtsH somit essentiell ist.

- Die mutierten *ftsH*-Allele sollten in *B. subtilis* eingebracht und das wildtypische *ftsH* deletiert werden. Der Phänotyp der so erzeugten Mutanten sollte hinsichtlich des filamentösen Wachstums, der Sporulation, der Sensitivität gegenüber Hitzeschock und hyperosmotischen Bedingungen analysiert werden.

- Als nächstes sollte untersucht werden, ob die Mutationen einen Einfluss auf die Sekretion ausüben, was an Hand der Exoprotease Subtilisin nachgewiesen werden sollte, und wie sie sich auf die ATPase- bzw. Protease-Aktivität auswirken.
- Des weiteren sollte auf RNA-Ebene geklärt werden, bei welchem Schritt der Sporulation zum erstenmal essentiell ist und ob eine Spo0A-Mutante, die auch ohne Phosphorylierung aktiv ist, den Sporulationsdefekt einer *ftsH*-Nullmutante komplementieren kann.

2 Material und Methoden

2.1 Bakterienstämme, Hefestämme, Plasmide, Oligonukleotide und Antikörper

2.1.1 Bakterienstämme

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tab. 1: Zusammenfassung der verwendeten Bakterienstämme. Angegeben sind der Name, der Genotyp und die Referenz für jeden Stamm. Die mit (*) gekennzeichneten Stämme wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit konstruiert.

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> JM109	<i>recA1, supF, endA1, gyrA96, hsdR, relA, thi, Δ(lac-proAB), [F' traD36 proAB⁺ lacI^q Δ(lacZ)M15]</i>	Yannisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
<i>E. coli</i> A8926	<i>sfhC zad220: Tn10 ΔftsH:: Kn^r</i>	Oppenheim <i>et al.</i> , 1999
<i>E. coli</i> DH5α	<i>endA1, F⁻, gyrA96 hsdR17, (r_k⁻, m_k⁺), lacZΔM15, recA1, supE44, λ⁻, deoR, thi⁻1, φ80d, Δ(lacZYA-argF) U169</i>	Bethesda-Research Laboratories
<i>E. coli</i> KM01	<i>E. coli</i> A8926 mit Integration von pKM01, Kn ^r , Ap ^r	*
<i>E. coli</i> KM02	<i>E. coli</i> A8926 mit Integration von pKM02, Kn ^r , Ap ^r	*
<i>E. coli</i> KM03	<i>E. coli</i> A8926 mit Integration von pKM03, Kn ^r , Ap ^r	*
<i>E. coli</i> KM04	<i>E. coli</i> A8926 mit Integration von pKM04, Kn ^r , Ap ^r	*
<i>E. coli</i> KM05	<i>E. coli</i> A8926 mit Integration von pKM05, Kn ^r , Ap ^r	*
<i>B. subtilis</i> 1012	<i>leuA8, metB5, trpC2, hsrM1</i>	Saito <i>et al.</i> , 1979
<i>B. subtilis</i> WW01	<i>B. subtilis</i> ΔftsH:: <i>erm</i> , Em ^r	W. Wehrli, 1999
<i>B. subtilis</i> amyE::neo	<i>B. subtilis</i> 1012 mit <i>neo</i> -Insertion in <i>amyE</i> , Neo ^r	T. Wiegert
<i>B. subtilis</i> AS10	<i>B. subtilis</i> <i>spo0A</i> ::Tn917, Em ^r	Schulz, 1995
<i>B. subtilis</i> SIK190	<i>amyE</i> ::(<i>Pspac-spo0A-sad67D56N cat</i>); <i>spo0A</i> :: <i>erm</i> , Em ^r , Cm ^r	Ireton <i>et al.</i> , 1993
<i>B. subtilis</i> KM01	<i>B. subtilis</i> 1012 mit Integration von pXEH01 in <i>amyE</i> , Cm ^r	*
<i>B. subtilis</i> KM02	<i>B. subtilis</i> 1012 mit Integration von pXEH02 in <i>amyE</i> , Cm ^r	*
<i>B. subtilis</i> KM03	<i>B. subtilis</i> 1012 mit Integration von pXEH03 in <i>amyE</i> , Cm ^r	*

<i>B. subtilis</i> KM04	<i>B. subtilis</i> 1012 mit Integration von pXEH04 in <i>amyE</i> , Cm ^r	*
<i>B. subtilis</i> KM05	<i>B. subtilis</i> 1012 mit Integration von pXEH05 in <i>amyE</i> , Cm ^r	*
<i>B. subtilis</i> KMA01	<i>B. subtilis</i> Δ <i>ftsH</i> :: <i>erm</i> mit Integration von pXEH01 in <i>amyE</i> , Em ^r , Cm ^r	*
<i>B. subtilis</i> KMA02	<i>B. subtilis</i> Δ <i>ftsH</i> :: <i>erm</i> mit Integration von pXEH02 in <i>amyE</i> , Em ^r , Cm ^r	*
<i>B. subtilis</i> KMA03	<i>B. subtilis</i> Δ <i>ftsH</i> :: <i>erm</i> mit Integration von pXEH03 in <i>amyE</i> , Em ^r , Cm ^r	*
<i>B. subtilis</i> KMA04	<i>B. subtilis</i> Δ <i>ftsH</i> :: <i>erm</i> mit Integration von pXEH04 in <i>amyE</i> , Em ^r , Cm ^r	*
<i>B. subtilis</i> KMA05	<i>B. subtilis</i> Δ <i>ftsH</i> :: <i>erm</i> mit Integration von pXEH05 in <i>amyE</i> , Em ^r , Cm ^r	*
<i>B. subtilis</i> SIK Δ<i>ftsH</i>	<i>amyE</i> :: (<i>P</i> <i>spac-sad67D56N</i> cat); <i>spo0A</i> :: <i>erm</i> ; Δ <i>ftsH</i> :: <i>tet</i> , Em ^r , Cm ^r , Tet ^r	*

2.1.2 Plasmide

Alle in dieser Arbeit verwendeten und konstruierten Plasmide sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tab. 2: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide. Angegeben sind der Name und die Größe jedes Plasmids, sowie eine Kurzbeschreibung und die zugehörige Referenz. Die mit (*) gekennzeichneten Plasmide wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit konstruiert.

Name	Größe (kb)	Bemerkung	Referenz
pEH01	4,56	pUC18 mit deletierter <i>mcs</i> und 28 bp Linker mit <i>Bgl</i> II-, <i>Eco</i> RV- und <i>Bam</i> HI-Schnittstelle, mit 1,9 kb <i>ftsH</i> -Amplicon aus <i>B. subtilis</i> zwischen <i>Bam</i> HI- und <i>Bgl</i> II-Schnittstelle, Ap ^r	E. Harfst, 1999
pEH02	4,56	pEH01 mit mutiertem Walkermotiv des <i>ftsH</i> -Gens, Basenaustausch von A621 gegen T (K207 zu N), Ap ^r	E. Harfst, 1999
pEH03	4,56	pEH01 mit mutiertem Zink-Bindungs-Motiv des <i>ftsH</i> -Gens, Basenaustausch von G1270 gegen C (E424 zu Q), Ap ^r	E. Harfst, 1999

pEH04	4,56	pEH01 mit mutiertem Zink-Bindungs-Motiv des <i>ftsH</i> -Gens, Basenaustausch von A1271 gegen C (E424 zu A), Ap ^r	E. Harfst, 1999
pEH05	4,56	pEH01 mit mutiertem Walkermotiv des <i>ftsH</i> -Gens, Basenaustausch von A621 gegen T (K207 zu N) und mit mutiertem Zink-Bindungs-Motiv des <i>ftsH</i> -Gens, Basenaustausch von G1270 gegen C (E424 zu Q), Ap ^r	E. Harfst, 1999
pX	7,50	Xylose-induzierbarer Expressionsvektor mit 5' und 3' <i>amyE</i> -Sequenz zur Integration in <i>B. subtilis</i> , Ap ^r , Cm ^r	Kim, 1995
pXEH01	9,43	pX mit 1,9 kb <i>Bam</i> HI- <i>Bgl</i> II- <i>ftsH</i> -Fragment aus pEH01 in <i>Bam</i> HI-Schnittstelle	* neu konstruiert, ursprünglich E.Harfst. 1999
pXEH02	9,43	pX mit 1,9 kb <i>Bam</i> HI- <i>Bgl</i> II- <i>ftsH</i> -Fragment aus pEH02 in <i>Bam</i> HI-Schnittstelle	E. Harfst, 1999
pXEH03	9,43	pX mit 1,9 kb <i>Bam</i> HI- <i>Bgl</i> II- <i>ftsH</i> -Fragment aus pEH03 in <i>Bam</i> HI-Schnittstelle	* neu konstruiert, ursprünglich E.Harfst. 1999
pXEH04	9,43	pX mit 1,9 kb <i>Bam</i> HI- <i>Bgl</i> II- <i>ftsH</i> -Fragment aus pEH04 in <i>Bam</i> HI-Schnittstelle	E. Harfst, 1999
pXEH05	9,43	pX mit 1,9 kb <i>Bam</i> HI- <i>Bgl</i> II- <i>ftsH</i> -Fragment aus pEH05 in <i>Bam</i> HI-Schnittstelle	E. Harfst, 1999
pGEX-2T	5,74	IPTG-induzierbarer Expressionsvektor mit Einbau der Sequenz der Glutathion-S-Transferase, Ap ^r	Smith und Johnson <i>et al.</i> , 1988
pKM01	6,86	pGEX-2T mit Einbau der Nukleotidsequenz des <i>ftsH</i> -Gens aus pEH01 (1911 bp)	*
pKM02	6,86	pGEX-2T mit Einbau der Nukleotidsequenz des <i>ftsH</i> -Gens aus pXEH02 (1911 bp)	*
pKM03	6,86	pGEX-2T mit Einbau der Nukleotidsequenz des <i>ftsH</i> -Gens pEH03 (1911 bp)	*
pKM04	6,86	pGEX-2T mit Einbau der Nukleotidsequenz des <i>ftsH</i> -Gens pEH04 (1911 bp)	*
pKM05	6,86	pGEX-2T mit Einbau der Nukleotidsequenz des <i>ftsH</i> -Gens pXEH05 (1911 bp)	*

2.1.3 Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit zu Klonierungen, PCR-Reaktionen und Sequenzierungen benutzten Desoxyribonukleotide sind in Tabelle 4 aufgeführt. Sie wurden von der Firma MWG bezogen.

Tab. 3: Liste der verwendeten Desoxyribonukleotide. Angegeben sind der Name, die Länge, der Verwendungszweck und die Nukleotidsequenz.

Name	Länge (bp)	Verwendung	Sequenz in 5'→3' Richtung
ftsh-5	36	PCR-Primer	GGC CAT GGA TCC ATG AAT CGG GTC TTG CGT AAT ACC
ftsh-3	39	PCR-Primer	GGC CAT AGA TCT TTA CTC TTT CGT ATC GTC TTT CTT TTC
ftsH-seq-Walker	24	Sequenzierung	GCC GAG CTC GGC GCC AGA ATA CCG
ftsH-seq-Zn	24	Sequenzierung	GAA GCG ACG GAC CGT GTA ATT GCC
FtsH-3 Sonde	45	<i>in-vitro</i> -Traskription	CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG AGA GAC TAA AAG CAC GCC TTT CGG
spo0A-5 Sonde	20	<i>in-vitro</i> -Traskription	GTG GAG AAA ATT AAA GTT TG
spo0A-3 Sonde	43	<i>in-vitro</i> -Traskription	CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG AGA TTA AGA AGC CTT ATG CTC T
abrB-5 Sonde	20	<i>in-vitro</i> -Traskription	ATG TTT ATG AAA TCT ACT GG
abrB-3 Sonde	43	<i>in-vitro</i> -Traskription	CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG AGA TTT AAG GTT TTG AAG CTG G
spo0E-5 Sonde	19	<i>in-vitro</i> -Traskription	ATG GGC CGT TCT TCT GAA C
spo0E-3 Sonde	45	<i>in-vitro</i> -Traskription	CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG AGA TTT ATT TGC ATC ATA TGC TGG
sinR-5 Sonde	21	<i>in-vitro</i> -Traskription	TTG ATT GGC CAG CGT AAT AAA
sinR-3 Sonde	45	<i>in-vitro</i> -Traskription	CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG AGA CTC CTC TTT TTG GGA TTT TCT

2.1.4 Antikörper

Die in der vorliegenden Arbeit für Immunoblots verwendeten mono- bzw. polyklonalen Antikörper sind in Tabelle 5 mit Namen, eingesetzter Verdünnung und Referenz angegeben. Sie wurden aus Kaninchen gewonnen.

Tab. 4: Liste der verwendeten Antikörper. Angegeben sind der Name, die eingesetzte Verdünnung sowie die Referenz.

Name	Verdünnung/Verwendung	Referenz
<i>B. subtilis</i> Anti-FtsH	1 : 5000	Deuerling, 1996
<i>B. subtilis</i> Anti-Spo0A	1 : 1000	Losick
Anti-Rabbit Ig	1 : 5000	<u>Sigma</u>

2.2 Nährmedien, Puffer und Lösungen

Wachstumsmedien wurden bei 121°C und 1,2 bar Überdruck für 20 min autoklaviert. Antibiotika wurden nach Abkühlen der Medien auf ca. 45°C in Form von Stammlösungen steril zugegeben. Glasgeräte wurden je nach Größe 30 min bis 3 h bei 180°C im Trockenschrank sterilisiert.

2.2.1 Nährmedien

Nährmedien sowie Lösungen wurden wie in Sambrook und Russel (2001) beschrieben verwendet.

Sporulationsmedium DSM:

8,0 g Difco Nutrient Broth

1,0 g KCl

0,25 g MgSO₄ x 7 H₂O

ad 1l Aqua bidest.

⇒ pH-Wert mit HCl auf 7,0 einstellen

Zusatz für Festmedien: 15,0 g Agar / Liter

Nach dem Autoklavieren 10 µM MnCl₂ und 1 µM FeSO₄ steril zugeben.

2.2.2 Antibiotika-Lösungen

Im Folgenden sind die in dieser Arbeit verwendeten Antibiotika-Lösungen sowie ihre Anwendungskonzentrationen aufgeführt (Tabelle 6). Wasserlösliche Antibiotika wurden sterilfiltriert. Alle Stammlösungen wurden bei -20°C aufbewahrt. Bakterien wurden immer in Nährmedien bzw. auf Platten unter Zusatz der entsprechenden Antibiotika kultiviert.

Tab. 5: Zusammenfassung der verwendeten Antibiotika-Lösungen. Angegeben sind der Name, die Konzentration der Stammlösung, das Lösungsmittel sowie die für den jeweiligen Bakterienstamm eingesetzte Endkonzentration. Die Zusätze „c“ bzw. „p“ in der Spalte „Stamm“ bezeichnen chromosomal bzw. plasmidal codierte Resistenzen.

Antibiotikum	Konzentration der Stammlösung [mg/ml]	Lösungsmittel	Endkonzentration [$\mu\text{g/ml}$]	Stamm
Ampicillin [Ap]	100	EtOH (70 %)	100	<i>E. coli</i> / p
Erythromycin [Em]	1 bzw. 100	EtOH abs.	1 bzw. 100	<i>B. subtilis</i> / c
Chloramphenicol [Cm]	5 bzw. 20	EtOH abs.	5 bzw. 20	<i>B. subtilis</i> / c
Tetracyclin [Tet]	10	EtOH abs.	10	<i>E. coli</i> / p
Kanamycin [Kan]	20	EtOH abs.	20	<i>E. coli</i> / p

2.3 Biochemikalien, Chemikalien, Enzyme, Molekulargewichts-Standards und verwendete Kits

Biochemikalien und Chemikalien wurden, wenn nicht anders vermerkt, von den Firmen Roche, Gibco-BRL, Difco, Pharmacia, Qiagen, Roth, Merck, Sigma, Sankyo, Serva und Macherey und Nagel bezogen. Enzyme wurden von den Firmen Roche, Merck, Sigma und BIOzym, Restriktionsenzyme von Gibco-BRL, MBI-Fermentas, New England Biolabs, Roche und Stratagene erworben.

Zur Bestimmung von DNA-Fragmentlängen in Agarose-Gelen wurde die *EcoRI*-hydrolysierte DNA des Phagen SPP1 (Roche) verwendet. Es ergaben sich folgende Fragmentgrößen: [bp] 7980, 7080, 5960, 4770, 3430, 2730, 1930, 1830, 1480, 1260, 1110, 890, 680, 490 und 390.

Zur Bestimmung von DNA-Fragmentlängen kleiner 1 kb wurde die 100-bp Leiter der Firma MBI-Fermentas mit den folgenden Fragmentgrößen benutzt: [bp] 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 und 80.

Die Größenbestimmung von RNA erfolgte mit dem RNA-Standard der Firma Gibco-BRL mit den Fragmentgrößen: [kb] 9.49, 7.46, 4.40, 2.37, 1.35 und 0.24. Alternativ wurde ein RNA-Standard der Firma MBI-Fermentas verwendet, der folgende Fragmentgrößen lieferte: [kb] 6.0, 4.0, 3.0, 2.0, 1.5, 1.0, 0.5 und 0.2.

Als Proteinstandard zur Bestimmung des Molekulargewichts von Proteinen in SDS-Polyacrylamid-Gelen nach Western-Blot wurde der „Prestained SDS Molecular Weight“-Standard (SDS-7B) von Sigma verwendet. Er besteht aus folgenden Proteinen: α -Macroglobulin (180 kDa), β -Galaktosidase (116 kDa), Fruktose-6-Phosphat-Kinase (84 kDa), Pyruvat-Kinase (58 kDa), Ovalbumin (45 kDa), Lactat-Dehydrogenase (36,5 kDa) und Triosephosphat-Isomerase (26,6 kDa).

Zur Bestimmung des Molekulargewichts von Proteinen in Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamid-Gelen wurde der „LMW Electrophoresis Calibration Kit“ von Biorad verwendet, der folgende Proteine enthält: Phosphorylase B (97 kDa), Albumin (66 kDa), Ovalbumin (45 kDa), Carboanhydrase (30 kDa), Trypsin-Inhibitor (20,1 kDa) und α -Lactalbumin (14,4 kDa).

Die verwendeten Kits wurden von den Firmen BIOzym, Roche, Gibco-BRL und Macherey und Nagel bezogen.

2.4 Molekulargenetische Methoden

2.4.1 Allgemeine, genetische und biochemische Methoden

Allgemeine, genetische und biochemische Methoden wurden, wenn nicht anders beschrieben, nach Standardprotokollen durchgeführt (Sambrook und Russel, 2001). Kulturmedien sowie Lösungen wurden wie in Sambrook und Russel (2001) beschrieben verwendet.

2.4.2 Sporulationstest

Die Sporulationstests wurden wie von Harwood *et. al.* 1990 beschrieben durchgeführt.

2.4.3 Subtilisintest

Die Subtilisintests wurden wie von Deuerling *et. al.* 1997 beschrieben durchgeführt.

2.4.4 Herstellung und Transformation von kompetenten *B. subtilis*-Zellen

B. subtilis-Zellen erreichen beim Übergang von der logarithmischen in die stationäre Wachstumsphase den Zustand natürlicher Kompetenz, in dem sie fähig sind, DNA aufzunehmen. Die Herstellung kompetenter Zellen und die Transformation wurden wie bei Anagnostopoulos und Spizizen (1961) beschrieben durchgeführt.

2.4.5 Herstellung und Transformation RbCl-kompetenter *E. coli*-Zellen

Die Behandlung der Zellen mit RbCl induziert die Kompetenz des Bakteriums, d.h. die Aufnahme von DNA ins Zellinnere. Die Herstellung und die Transformation von kompetenten *E. coli*-Zellen wurde wie bei Cohen (1972) durchgeführt.

2.4.6 Isolierung von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab (Boiling Prep)

Die Isolierung von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab wurde nach der Methode von Holmes und Quigley (1981) durchgeführt.

2.4.7 Isolierung von Plasmid-DNA im mittleren Maßstab (Midi Prep)

Die Isolierung von Plasmid-DNA im mittleren Maßstab erfolgte mit Hilfe des Nucleobond AX 100 Kits der Firma Macherey und Nagel nach Angaben des Herstellers.

2.4.8 Isolierung chromosomaler DNA von *B. subtilis*

Chromosomale DNA von *B. subtilis* wurde nach der von Smith *et al.* (1989) beschriebenen CTAB-Methode isoliert.

2.4.9 Reinigung von DNA

Die Entfernung von Proteinen, Nukleotiden und Oligonukleotiden erfolgte mit dem CONCERT Rapid PCR Purification-System der Firma Gibco-BRL bzw. mit dem Nucleo-Spin-Kit der Firma Macherey und Nagel nach den Angaben des Herstellers.

Hydrolysierte DNA-Fragmente oder PCR-Produkte, die nach Auftrennung im Agarose-Gel weitere unspezifische Banden aufwiesen, wurden aus dem Gel extrahiert. Zur Extraktion wurde das CONCERT Rapid Gel Extraction-Kit der Firma Gibco-BRL verwendet. Zur Kontrolle wurden 1-3 µl des Eluats auf Integrität überprüft.

2.4.10 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte mit dem „Fast-Ligation-Kit“ der Firma BIOzym. Dabei wurde nach Angaben des Herstellers verfahren (10 µl oder 15 µl Gesamtvolumen), jedoch wurden die Ligationszeiten auf bis zu 60 min verlängert.

2.4.11 DNA-Amplifizierung mittels PCR

Die PCR-Reaktion wurde mit dem PCR-Kit der Firma New England Biolabs (Deep Vent®-DNA-Polymerase) und MBI-Fermentas (*Taq*-DNA-Polymerase) durchgeführt. Die Deep Vent®-DNA-Polymerase besitzt im Gegensatz zur *Taq*-DNA-Polymerase eine *Proofreading*-Aktivität und wurde deshalb zur DNA-Amplifizierung bei Klonierungen eingesetzt.

Die Reaktionen erfolgten nach den Angaben der Hersteller bzw. nach Sambrook und Russel (2001).

2.4.12 Anlegen von Glycerin-Dauerkulturen

Von dem zu konservierenden Bakterienstamm wurde eine 3-ml ÜNK angelegt, von der 1 ml mit 1 ml sterilem Glycerin versetzt wurde. Nach zweistündiger Inkubation bei RT und einstündiger Inkubation in Eis wurde die Kultur bei -20°C gelagert.

2.4.13 Sequenzierung

Für die Sequenzierungsreaktion wurde das DNA-Cycle-Sequencing-System-Kit der Firma Promega verwendet und nach den Angaben des Herstellers verfahren.

2.5 Arbeiten mit RNA

2.5.1 Probenentnahme zur RNA-Präparation

Jeweils 100 ml LB-Medium wurden in einem 300-ml-Kolben mit einer ÜNK des gewünschten Stammes auf eine OD₅₇₈ von 0,05 inokuliert und bei 37°C geschüttelt. Bei Erreichen der gewünschten OD₅₇₈ wurden dem Kolben 10 ml Bakterienproben entnommen und die Zellen abgetötet.

2.5.2 Isolierung von Gesamt-RNA aus *B. subtilis*

Die Präparation von Gesamt-RNA erfolgte nach der „Sauren-Phenol“-Methode (Völker *et al.*, 1994), wobei für die Isolation das leicht modifizierte Protokoll von Homuth (1997a) angewandt wurde. Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, dass die Bakterienzellen zunächst durch Lysozymbehandlung protoplastiert und anschließend durch Lysislösung und SDS lysiert werden. Bei der nachfolgenden Behandlung mit saurem Phenol gelangt die DNA in die organische Phase, die RNA verbleibt hingegen in der wässrigen Phase und kann anschließend gereinigt werden.

2.5.3 Elektrophorese von RNA in Agarose-Gelen und Transfer auf Nylonmembranen

Die Auftrennung der gereinigten RNA-Proben (2 µg) erfolgte in denaturierenden Agarose-Gelen (1.2 %) für 1-2 h bei Raumtemperatur und 80 V. Der anschließende Vakuum-Transfer wurde mit einer Vakuum-Blot-Anlage (VacuGeneTMX1) der Firma Pharmacia durchgeführt.

2.5.4 Herstellung DIG-markierter RNA-Sonden (Riboprobes)

Das gewünschte DNA-Fragment, von dem eine RNA-Sonde hergestellt werden sollte, wurde mittels PCR amplifiziert. Dabei wurde der 3'-Primer so gewählt, dass das entstehende PCR-

Produkt einen T7-Promotor enthielt, von dem aus die Synthese einer DIG-markierten Antisense-RNA erfolgen konnte. Für die *in-vitro*-Transkription wurde das „DIG-RNA-Labeling-Kit“ der Firma Roche verwendet.

2.5.5 Reinigung von DIG-markierten ssRNA-Sonden mittels Präabsorption

Beim erstmaligen Einsatz von DIG-markierten RNA-Sonden in Hybridisierungsexperimenten wurde häufig ein sehr starker Hintergrund auf den erhaltenen Röntgenfilmen festgestellt. Wurde die Sonde weiterhin benutzt, so nahm dieser Hintergrund kontinuierlich ab und verschwand schließlich vollständig. Dieses Phänomen ist bekannt, seine Ursache allerdings nicht (Sprenger *et al.*, 1995). Daher wurden die RNA-Sonden vor ihrer erstmaligen Verwendung zweimal durch Präabsorption gereinigt, woraufhin sich der beschriebene Hintergrund nicht mehr einstellte. Die Reinigung erfolgte nach dem von Homuth (1997a) beschriebenen Protokoll.

2.5.6 Hybridisierung membrangebundener RNA mit DIG-markierten ssRNA-Sonden

Die Hybridisierung mit DIG-markierten ssRNA-Sonden erfolgte nach dem Protokoll von Homuth (1997a).

2.5.7 Nachweis DIG-markierter Nukleinsäuren mittels Chemolumineszenz

Der Nachweis Digoxigenin-markierter Nukleinsäuren erfolgt in zwei Schritten. Zunächst bindet ein Konjugat aus dem F_{ab}-Fragment eines hochaffinen Anti-Digoxigenin-Antikörpers und dem Enzym alkalische Phosphatase spezifisch an die DIG-markierte Sonde. Dann erfolgt die Zugabe eines Chemolumineszenz-Substrats (CDP-Star[®], Firma TROPIX), welches durch die alkalische Phosphatase unter Lichtemission gespalten wird. Diese bis zu 24 h anhaltende Lichtemission bei 477 nm kann durch eine Schwärzung eines aufgelegten Röntgenfilms detektiert werden. Die Detektion erfolgte nach den Angaben des Herstellers und dem Protokoll von Homuth (1997a).

2.5.8 Entfernung von DIG-markierten ssRNA-Sonden von membrangebundener RNA

Um Northern-Blots nach einer Hybridisierung und anschließender Detektion mittels Chemolumineszenz wiederverwenden zu können, ist es möglich, die gebundene DIG-

markierte ssRNA-Sonde von der Nylonmembran durch Strippen wieder zu entfernen. Dies erfolgte nach dem von Homuth (1997b) beschriebenen Protokoll.

2.6 Arbeiten mit Proteinen

2.6.1 Gewinnung von nativen Zellextrakten aus *B. subtilis*

Zur Gewinnung von nativen Zellextrakten aus *B. subtilis* wurden geeignete Volumina einer Bakterienkultur entnommen. Nach Zentrifugation erfolgte der Aufschluss der in Natriumphosphat-Puffer resuspendierten Zellen durch Ultraschall-Behandlung. Unlösliche Bestandteile wurden abzentrifugiert.

2.6.2 Gewinnung von denaturierten Gesamtzellextrakten aus *B. subtilis*

Zur Gewinnung von denaturierten Gesamtzellextrakten aus *B. subtilis* wurde ein bestimmtes Volumen (entsprechend 0,5 - 10 OD₅₇₈) aus einer Bakterienkultur entnommen und abzentrifugiert. Anschließend wurden die resuspendierten Zellen durch Inkubation mit Lysozym aufgeschlossen. Nach Zugabe von 3 x Probenpuffer (Sambrook und Russel, 2001) konnten die Proteinproben bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt werden. Vor dem Auftragen auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel wurden die Proben für 5 min bei 95°C inkubiert.

2.6.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde die Methode nach Bradford *et al.* (1976) verwendet.

2.6.4 Elektrophorese in diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelen

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht wurde nach der Methode von Laemmli (1970) durchgeführt. In der vorliegenden Arbeit wurden 10 bzw. 12 %-ige SDS-Polyacrylamid-Gele benutzt, die Elektrophorese erfolgte in der Midget-Elektrophorese-Einheit der Firma Pharmacia für ca. 2 h bei 100 V.

2.6.5 Transfer von Proteinen auf Nitrocellulosemembranen (Western-Blot)

Zum immunologischen Nachweis von Proteinen wurden diese zunächst gelelektrophoretisch in einem SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt (Laemmli, 1970) und anschließend mittels Elektroblothing (Towbin *et al.*, 1979; Burnette, 1981) aus dem Gel auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Der Transfer erfolgte mittels „Semi-Dry-Blotting“ zwischen Elektrodenplatten in der „Fast Blot“-Apparatur der Firma Biorad nach den Angaben des Herstellers.

2.6.6 Immunologischer Nachweis membrangebundener Proteine

Nach Immobilisierung von Proteinen an Nitrocellulosemembranen können diese mit spezifischen primären Antikörpern nachgewiesen werden (Haas *et al.*, 1986). Der Nachweis der spezifischen Antigen-Antikörper-Komplexe erfolgte durch die Bindung eines zweiten, mit Meerrettich-Peroxidase konjugierten Anti-IgG-Antikörpers. Durch Zugabe eines Substrat-Chromogen-Gemisches kommt es zu einer Farbreaktion bzw. Chemolumineszenz (Leary *et al.*, 1983). Die praktische Durchführung des immunologischen Nachweises membrangebundener Proteine erfolgte wie bei Homuth (1997) beschrieben.

Als primäre Antikörper wurden in dieser Arbeit die in Tabelle B4 angegebenen Antikörper verwendet, als sekundärer Antikörper wurde das Anti-Rabbit IgG Horseradish Peroxidase Conjugate (*from donkey*; Amersham NA 934) verwendet.

2.6.7 Überproduktion, Isolierung und Reinigung von GST-Fusionsproteinen

Das Glutathion-S-Transferase (GST) Genfusionsystem stellt eine Möglichkeit zur Überexpression, Reinigung und Detektion von Fusionsproteinen in *E. coli* dar. GST ist ein 26 kDa Protein, welches mit voller enzymatischer Aktivität der Fusionsproteine exprimiert werden kann (Parker *et al.*, 1990). Die GST-Fusionsproteine können durch Affinitätschromatographie an Glutathion-Agarose (Sigma) isoliert und gereinigt werden.

In den *E. coli* Stamm A8926 wurden getrennt die Plasmide pKM01 bis pKM05 transformiert. Aus einer Übernachtskultur wurden am nächsten Morgen 300 ml LB + Ampicillin auf eine OD₆₀₀ von 0,05 inokuliert und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4-0,5 bei 30 °C inkubiert. Dann erfolgte die Zugabe von 1 mM IPTG und Inkubation der Kulturen bei 20 °C über Nacht. Am

nächsten Morgen wurden die Zellen bei 6000 rpm und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde mit 25 ml PBS gewaschen und erneut zentrifugiert.

Zur nativen Reinigung der Proteine wurde das Pellet in 5,5 ml PBS resuspendiert und eine Tablette Protease-Inhibitor (Boehringer Complete antiproteases EDTA free) und 20 mM DTT zugegeben. Anschließend wurden die Zellen mittels Ultraschall mit dem Sonifier-Cell-Disruptor-B15 (Branson) aufgeschlossen. Danach erfolgte eine Zentrifugation bei 12000 rpm und 4 °C für 15 min. Der Überstand wurde abgenommen und mit 600 µl Glutathion-Agarose (Sigma) versetzt. Zur Bindung der Fusionsproteine an die Agarose wurden die Ansätze über Nacht bei 4 °C geschüttelt. Am darauffolgenden Tag erfolgte eine Zentrifugation der Ansätze bei 2000 rpm und 4 °C für 2 min. Der Überstand wurde verworfen und die Agarose 3 x mit je 15 ml PBS gewaschen. Danach erfolgte die Elution der GST-Fusionsproteine mit 200 µl GSH-Elutionspuffer, wobei der erste Elutionsschritt 3 h und die beiden weiteren jeweils 1 h dauerten. Anschließend wurden die eluierten Proteine auf einem 12%igen SDS-Polyacrylamid-Gel analysiert.

PBS	8 g NaCl
	0,2 g KCl
	1,44 g Na ₂ HPO ₄
	0,24 g KH ₂ PO ₄
	⇒ pH-Wert auf 8,0 einstellen
	ad 1 l Aqua bidest., autoklavieren

GSH-Elutionspuffer	50 mM Tris/HCl, pH 8,0
	20 mM Glutathion
	ad 10 ml Aqua bidest.

2.6.8 Protease-Test

Durch ein Protease-Assay sollen die beiden GST-Fusionsproteine untersucht werden. Die Versuchsbedingungen wurden wie von Shotland *et al.* (1997) und Smith und Johnson (1988) beschrieben durchgeführt.

2.6.9 Gelfiltration

Um mit GST-Fusionsproteinen einen ATPase-Test durchführen zu können, musste jegliches Phosphat aus der Proteinlösung entfernt werden. Dies erfolgte durch Gelfiltration mit Hilfe von NAP-10 Säulen der Firma Pharmacia. Dabei beruht die Trennung von Proteinfraction und Salzfraktion bei der Elution von diesen Säulen darauf, dass den hochmolekularen Proteinen ein geringeres Volumen für die Wanderung durch die Säule zur Verfügung steht als den kleineren Salzen. Proteine verlassen somit die Säule zu einem früheren Zeitpunkt als die Salze.

Nach Entfernung der überschüssigen Flüssigkeit, mit der die Säule zur Lagerung überschichtet ist, wurde diese zunächst mit 3 x 5 ml 20 mM Tris/HCl, pH 7 äquilibriert. Anschließend wurde eine geeignete 0,5 ml Fraktion der Proteinelution aufgetragen. Nach dem vollständigen Eintreten der Flüssigkeit in das Gelbett wurden weitere 0,5 ml Äquilibrierungspuffer aufgegeben und wiederum bis zum völligen Eintritt in das Gelbett gewartet. Die Elution der Proteinfraction erfolgte durch Zugabe von 2 x 0,5 ml Äquilibrierungspuffer, wobei sich das Protein in der zweiten Elutionsfraktion befand. Dies wurde insgesamt drei Mal durchgeführt, wobei nach jeder Elution die Säule mit 3 x 5 ml Äquilibrierungspuffer von den Salzen gereinigt wurde. Nach Beendigung des Pufferwechsels wurde die Säule mit Äquilibrierungspuffer überschichtet und für weitere Entsalzungen des gleichen Proteins bei 4 °C aufbewahrt.

2.6.10 ATPase-Test

Um gereinigtes Protein auf dessen Aktivität als ATPase hin zu untersuchen, wurde basierend auf den Angaben von Turgay *et al.* (1997) und Lill *et al.* (1990) ein ATPase-Test durchgeführt. Der Test beruht darauf, dass sich freies P_i mit Molybdat zu Phosphomolybdat umsetzt, das bei geringem pH-Wert mit Malachitgrün einen Komplex bildet. Dieser kann photometrisch quantifiziert werden (Hess *et al.*, 1975). Eine Umrechnung der gemessenen Absorption in vorhandenes, d.h. durch enzymatische und spontane Hydrolyse aus ATP freigesetztes, P_i ermöglichte eine Eichgerade, die mit verschiedenen Verdünnungen einer KH_2PO_4 -Lösung erstellt wurde. Dabei erlaubt es die Sensitivität dieses Tests, P_i -Konzentrationen bis in den nanomolaren Bereich zu bestimmen. Neben dieser hohen Sensitivität und einer guten Farbstabilität hat dieser Test außerdem den Vorzug, dass durch die Zugabe von Citrat unmittelbar auf die Addition des Farbreagenzes der Ansatz unempfindlich gegenüber Phosphat wird, das erst nach dem Abstoppen der Enzymreaktion freigesetzt wird.

Der ATPase-Test wurde in einem Volumen von je 50 μl durchgeführt, wobei der Puffer folgende Zusammensetzung hatte: 50 mM Tris/HCl, pH 7, 30 mM KCl, 30 mM NH_4Cl , 0,5 mM $\text{Mg}(\text{OAc})_2$, $\pm 4,2$ mM ATP. Die Ansätze wurden für 15, 30, 45, 60, 75 bzw. 90 min im 40 °C Heizblock inkubiert, um eine zeitabhängige Zunahme der Menge an freigesetztem P_i aufgrund einer ATPase-Aktivität detektieren zu können. Zum Abstoppen der Enzymreaktion wurde direkt aufeinanderfolgend 800 μl Farbreagenz und 100 μl 34 % Citrat zugegeben. Für die Bestimmung des Nullwerts erfolgte keine Inkubation des 50 μl Reaktionsansatzes bei 40°C, sondern es wurden direkt nach Fertigstellung der Reaktionsansätze 800 μl Farbreagenz und 100 μl 34 % Citrat hinzugefügt. Vor der Messung der Absorption bei 660 nm wurde stets für 40 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Um die A_{660} -Messwerte in nMole freigesetztes P_i umrechnen zu können, musste eine Eichgerade mit KH_2PO_4 erstellt werden. Zunächst wurde eine kleine Menge an KH_2PO_4 für 4 h bei 100 °C getrocknet und damit anschließend eine 1 M KH_2PO_4 -Lösung gefertigt. Von einer daraus hergestellten Verdünnungsreihe wurden von Konzentrationen zwischen 200 μM und 2 μM je 50 μl mit 800 μl Farbreagenz und 100 μl 34 % Citrat in direkter Aufeinanderfolge zusammengegeben. Nach 40-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Absorptionsmessung bei 660 nm. Eine Auftragung dieser Messwerte gegen die im Ansatz enthaltene Stoffmenge P_i lieferte eine Eichgerade für die Umrechnung der A_{660} -Messwerte des ATPase-Tests in nMole freies P_i .

ATPase-Test Puffer:	97,1 mM Tris/HCl, pH 7 75 mM KCl 75 mM NH_4Cl 2,5 mM DTT 1,25 mM $\text{Mg}(\text{OAc})_2$
ATP-Stammlösung:	60 mg/ml bzw. 99,1 mM
KH_2PO_4 -Stammlösung:	1 M KH_2PO_4
Farbreagenz:	0,034 % Malachitgrün 0,1 % Triton-X-100 10,5 g/l Ammoniummolybdat in 1N HCl
Citrat	34 % Na-Citrat \cdot 2 H_2O in Aqua dest.

2.7 Konstruktion von Plasmiden und Stämmen

2.7.1 Konstruktion von Plasmiden

Der folgende Abschnitt enthält die Konstruktionsbeschreibungen sämtlicher in dieser Arbeit erstellten Plasmide. Der Ausgangsvektor und die DNA-Fragmente, die alle mit ausgewählten Oligonukleotiden sowie geeigneter Matrize amplifiziert worden sind, wurden mit entsprechenden Restriktionsendonukleasen hydrolysiert. Beim Ausgangsplasmid wurden nach der Hydrolyse gegebenenfalls die 5'-Enden mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert.

Alle DNA-Fragmente wurden mit dem Nucleospin-Kit (Macherey&Nagel), mit dem QiaexII Gel Extraction-Kit (Qiagen) oder über ein präparatives Agarosegel gereinigt.

Nach der Ligation mit dem „Fast Link DNA Ligation Kit“ (BIOzym) erfolgte die Transformation der ligierten DNA in *E. coli*. Dafür wurde der Stamm *E. coli* JM109 verwendet. Als Negativkontrolle diente ein hydrolysiert Vektor ohne DNA-Fragment. Die Transformanten wurden zur Selektion auf entsprechende antibiotikahaltige LB-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Durch Isolierung von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab bzw. über Kolonie-PCR konnte die Aufnahme des Plasmids überprüft werden. Von positiven Klonen wurde anschließend DNA im mittleren Maßstab (Midiprep) isoliert und das neukonstruierte Plasmid nochmals über Hydrolyse mit geeigneten Restriktionsendonukleasen sowie durch eine „Extended Hot-Shot“-DNA-Sequenzierung durch die Firma Seqlab/Göttingen überprüft.

2.7.1.1 Konstruktion von pKM01-05

Als Ausgangsplasmid wurde hier pGEX2T (Smith und Johnson *et al.*, 1988) verwendet. Dieser besitzt einen IPTG-induzierbaren Promotor, was die kontrollierte Expression der stromabwärts gelegenen Gene ermöglicht und einen codierenden Bereich für die Glutathion-S-Transferase (GST). Das gewünschte Gen (im besonderen solche, die für Membranproteine codieren) kann mit dem N-Terminus an diesen GST-Tag fusioniert werden. Bei Expression entsteht also ein Fusionsprotein. Der Tag ist dabei in der Lage, das fusionierte Protein in der nativen Konformation in Lösung zu halten. Des weiteren ist eine native Aufreinigung des Fusionsproteins über Affinitätschromatographie möglich.

Im Falle von pKM01, 03 und 04 wurde der Ausgangsvektor mit der Restriktionsendonuklease *Bam*HI hydrolysiert und die aus den Vektoren pEH01, 03 und 04 mit *Bam*HI und *Bgl*II ausgeschnittenen *ftsH*-Gene über diese Schnittstelle eingebracht. Im Falle von pKM02 und 05 wurde der Ausgangsvektor mit der Restriktionsendonuklease *Bam*HI hydrolysiert und die aus den Vektoren pXEH02 und 05 amplifizierten *ftsH*-Gene über diese Schnittstelle eingebracht. Die verwendeten Oligonukleotide sind mit ftsh-5 und ftsh-3 bezeichnet.

2.7.1.2 Konstruktion von pXEH01 und pXEH03

Der hier verwendete Ausgangsvektor pX (Kim *et al.*, 1995) besitzt einen Xylose-induzierbaren Promotor, hinter welchen beliebige Gene kloniert werden können. Dies macht eine kontrollierte Genexpression durch Xylose-Zugabe möglich. Der Vektor besitzt eine Ampicillin-Resistenz zur Selektion in *E. coli* und eine Chloramphenicol-Resistenz zur Selektion in *B. subtilis*. Der Einbau der *ftsH*-Gene erfolgte über Hydrolyse des Vektors mit dem Restriktionsenzym *Bam*HI. Die *ftsH*-Gene wurden zuvor aus den Vektoren pEH01 und pEH03 mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Bgl*II ausgeschnitten und über die genannte Schnittstelle eingebracht.

2.7.2 Konstruktion von Bakterienstämmen

2.7.2.1 Konstruktion von *E. coli*-Stämmen

Die Konstruktion der verschiedenen *E. coli*-Stämme KM01-05 erfolgte durch Transformation der in Tabelle 3 aufgeführten Plasmide pKM01-05 in den entsprechenden *E. coli*-Stamm. Die erfolgreiche Transformation wurde zum einen durch Selektion auf antibiotikahaltigem Medium überprüft, und zum anderen durch eine Isolierung von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab (Boiling Prep, Holmes und Quickley, 1981) und anschließendem Kontrollverdau.

2.7.2.2 Konstruktion von *B. subtilis*-Stämmen

Zur Konstruktion der genetisch veränderten *B. subtilis*-Stämme KM01-05 wurden die in Tabelle 3 aufgeführten Integrationsvektoren pXEH01-05 verwendet und in *B. subtilis* 1012 transformiert.

Die Selektion der Transformanten erfolgte auf LB-Platten mit einer 5 µg Chloramphenicol-Konzentration.

Zur Konstruktion der genetisch veränderten *B. subtilis*-Stämme KMΔ01-Δ05 wurde in den *B. subtilis*-Stämmen KM01-05 das ursprüngliche *ftsH*-Gen durch Transformation mit chromosomaler DNA aus dem Stamm *B. subtilis* WW01 gegen eine Erythromycin-Kassette ersetzt.

Die Selektion der Transformanten erfolgte auf LB-Platten mit einer Erythromycin-Konzentration von 1 µg/ml bzw. 100 µg/ml, bzw. 5 µg Chloramphenicol. Nur Transformanten mit einem Doppelcrossover-Ereignis sind in der Lage, auf Em-Platten mit einer Konzentration von 100 µg/ml zu wachsen.

Zur Konstruktion der *B. subtilis*-Stammes SIK Δ*ftsH* wurde in dem *B. subtilis*-Stamm SIK190 das *ftsH*-Gen durch Transformation mit chromosomaler DNA aus dem Stamm *B. subtilis* WW01 gegen eine Erythromycin-Kassette ersetzt.

Die Selektion der Transformanten erfolgte auf LB-Platten mit einer Erythromycin-Konzentration von 1 µg/ml bzw. 100 µg/ml, bzw. 5 µg Chloramphenicol, oder 10 µg Tetracyclin. Nur Transformanten mit einem Doppelcrossover-Ereignis sind in der Lage, auf Em-Platten mit einer Konzentration von 100 µg/ml zu wachsen.

3. Ergebnisse

3.1 Untersuchung des Einflusses von Punktmutationen im ATPase- und Zinkbindungs-Motiv von FtsH

Die membrangebundene, ATP- und Zn^{2+} -abhängige Metalloprotease FtsH ist ein hoch konserviertes Protein. In *E. coli* wurde bereits im konservierten Bereich der Walker-A-Box von FtsH ein Lysinrest gegen einen Asparaginrest ausgetauscht, was zum Verlust der ATPase-Aktivität führte (Akiyama *et al.*, 1996a). Des weiteren wurde in den *ftsH*-Homologen aus Hefe YTA10 und YTA12 im konservierten Zinkbindungs-motiv der Glutamatrest durch einen Glutaminrest ersetzt, wodurch die Proteaseaktivität verloren ging (Arlt *et al.*, 1996).

In ihrer Diplomarbeit konstruierte Eva Harfst 1999 vier *B. subtilis ftsH*-Allele, indem sie gezielt Aminosäuren in der Walker-A-Box und im Zinkbindungs-motiv austauschte, wie sie bereits für *E. coli*- und Hefe-FtsH beschrieben wurden. Diese mutierten *ftsH*-Gene, und ein wildtypisches zur Kontrolle brachte sie in den pX-Vektor ein. Dadurch wurden sie unter die Kontrolle eines Xylose-induzierbaren Promotors gestellt und befanden sich zwischen einer *amyE*-Front- und einer *amyE*-Back-Sequenz, um so eine Integration in das *B. subtilis*-Chromosom über ein Doppelcrossover im *amyE*-Gen zu ermöglichen. Die Plasmide wurden pXEH01, pXEH02, pXEH03, pXEH04 und pXEH05 genannt.

Diese sollten nun in einen wildtypischen und in einen FtsH-defizienten *B. subtilis*-Stamm eingebracht und näher untersucht werden, um die Daten mit denen aus *E. coli* und Hefe zu vergleichen.

Tab. 6: Aufstellung der verwendeten Plasmide / *ftsH*-Allele

Plasmid	<i>FtsH</i> -Allel	Punktmutation
pXEH01	FtsH01	wildtypisches FtsH
pXEH02	FtsH02	K207N, Walker-A-Box
pXEH03	FtsH03	E424Q, Zinkbindungs-motiv
pXEH04	FtsH04	E424A, Zinkbindungs-motiv
pXEH05	FtsH05	K207N, E424Q, Walker-A-Box und Zinkbindungs-motiv

3.1.1 Konstruktion der zu untersuchenden Stämme

Die oben beschriebenen *ftsH*-Allele wurden im Folgenden, wie unter 2.7.2.2 beschrieben, in *B. subtilis amyE::neo* eingebracht. Die resultierenden Stämme sind *B. subtilis* KM01, KM02, KM03, KM04 und KM05, die zusätzlich zu ihrem wildtypischen *ftsH* auch jeweils ein Xylose-induzierbares Allel tragen.

Bei diesen Stämmen wurde nun, wie unter 2.7.2.2 beschrieben, das wildtypische *ftsH* durch eine Erythromycin-Kassette ersetzt. Daraus entstanden die Stämme *B. subtilis* KMΔ01, KMΔ02, KMΔ03, KMΔ04 und KMΔ05, die jetzt also nur noch die Xylose-induzierbaren Allele tragen. Auf diese Weise sollte untersucht werden, ob FtsH auch ohne seine ATPase- oder seine Protease-Aktivität, oder gar ohne beide, noch Funktionen ausüben kann.

Tab. 7: Aufstellung der konstruierten Stämme mit integriertem *ftsH*-Allel

Stamm	wt <i>ftsH</i>	Xylose-induzierbares <i>ftsH</i> -Allel
KM01	+	wildtypisches FtsH
KM02	+	K207N, Walker-A-Box
KM03	+	E424Q, Zinkbindungsmotiv
KM04	+	E424A, Zinkbindungsmotiv
KM05	+	K207N, E424Q, Walker-A-Box und Zinkbindungsmotiv
KMΔ01	-	wildtypisches FtsH
KMΔ02	-	K207N, Walker-A-Box
KMΔ03	-	E424Q, Zinkbindungsmotiv
KMΔ04	-	E424A, Zinkbindungsmotiv
KMΔ05	-	K207N, E424Q, Walker-A-Box und Zinkbindungsmotiv

Um zu gewährleisten, dass die Stämme *B. subtilis* KMΔ01-Δ05 wirklich nur noch die induzierbaren Allele trugen, wurden ein Western-Blot und ein immunologischer Nachweis der Proteine mit Antikörpern gegen das FtsH-Protein durchgeführt. Das zugehörige Luminogramm ist in Abbildung 8 dargestellt.

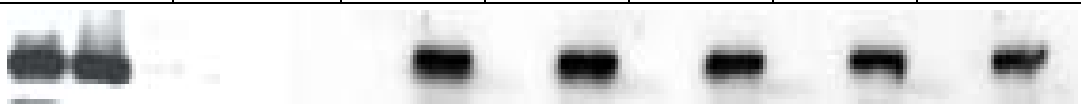
	1012		WW01		KMΔ01		KMΔ02		KMΔ03		KMΔ04		KMΔ05	
Xylose	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
α FtsH														

Abb. 8: Luminogramm der Western-Blot-Analyse der Stämme *B. subtilis* KMΔ01-Δ05 mit und ohne Xylose unter Verwendung der Antikörper gegen FtsH (70,9 kDa). Aus Übernachtskulturen wurden am nächste Morgen je 50 ml LB-Medium mit und ohne 1% Xylose auf eine OD₅₇₈ von 0,05 inokuliert und bei 37°C inkubiert. Bei einer OD₅₇₈ von 0,8 wurden Proben genommen und, wie in Abschnitt 3.5.2 beschrieben, denaturierte Zellextrakte gewonnen. Die Gesamtzelextrakte (Auftragung gleicher Zellzahlen) wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Das FtsH-Protein wurde mit Anti-FtsH-Antikörpern detektiert.

Auf dem erhaltenen Luminogramm sind die erwarteten Banden des FtsH-Proteins bei 70,9 kDa erkennbar. Der Wildtyp als Positiv-Kontrolle zeigt gleich starke Banden mit und ohne Xylose. Bei WW01, der Negativ-Kontrolle, sind keine Banden erkennbar und die Stämme KMΔ01-Δ05 haben nur in den Proben mit Xylose eine FtsH-Bande, die fast so ausgeprägt wie die des Wildtyps ist. Das wildtypische *ftsH* wurde also erfolgreich deletiert und die ektopisch integrierten Allele werden nur in Anwesenheit von Xylose exprimiert. Somit konnten die Stämme für die weiteren Untersuchungen verwendet werden.

3.1.2 Vergleich der Morphologien während des exponentiellen Wachstums

Es wurde bereits beschrieben, dass ein phänotypisches Merkmal einer *B. subtilis ftsH*⁻ - Mutante filamentöses Wachstum ist (Deuerling *et al.*, 1997). Daher sollte nun die Morphologie der Stämme KM01-05 und KMΔ01-Δ05 während des exponentiellen Wachstums mit und ohne Xylose betrachtet werden. Die Stämme KM01-05 sind insofern von Interesse, dass FtsH-Oligomere (wahrscheinlich Hexamere) bildet (Niwa *et al.*, 2002), und gemischte Komplexe bestehend aus wildtypischem FtsH und mutierten FtsH's eventuell, auf Grund negativer Transdominanz, andere Phänotypen hervorrufen als die, welche nur aus Wildtyp- oder Mutanten-FtsH bestehen. Verglichen mit den Stämmen KMΔ01-Δ05 könnten sich daraus Rückschlüsse auf die genauere Auswirkung der jeweiligen Aminosäureaustausche auf das Protein ziehen lassen.

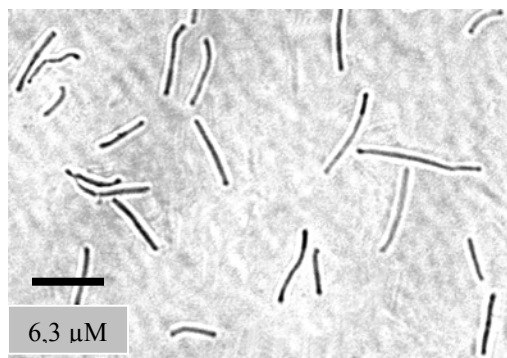
Daher wurden alle 10 Stämme und als Kontrollen *B. subtilis* 1012 und WW01 mikroskopisch auf Veränderungen in ihrer Zellmorphologie in Flüssigmedium während der exponentiellen Phase untersucht.

Tab. 8: Zellmorphologie verschiedener *B. subtilis*-Stämme

	Xylose im Medium	
	abwesend	anwesend
1012	-	-
WW01	+	+
KM01	-	-
KM02	-	-
KM03	-	-
KM04	-	-
KM05	-	-
KMΔ01	+	-
KMΔ02	+	+
KMΔ03	+	+
KMΔ04	+	+
KMΔ05	+	+

Von den Stämmen KM01-05 und KMΔ01-Δ05 wurden Übernachtskulturen angelegt, aus denen am nächsten Morgen je 50 ml LB-Medium mit und ohne 1% Xylose auf eine OD₅₇₈ von 0,05 inokuliert und bei 37°C inkubiert wurden. Bei einer OD₅₇₈ von 0,8 wurden Proben entnommen und unter dem Mikroskop untersucht. In der Tabelle steht (-) für normale stäbchenförmige Morphologie und (+) für filamentöses Wachstum.

A



B

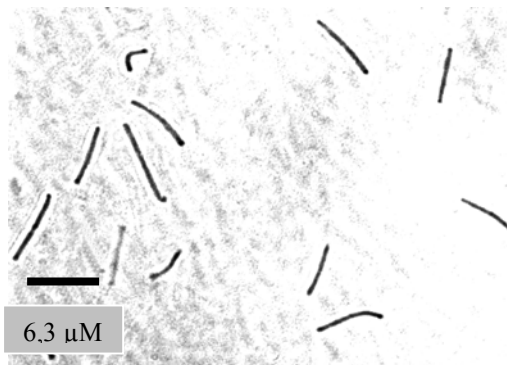


Abb. 9: Mikroskopische Aufnahme von *B. subtilis* 1012.

DIC-Optik. Optischer Vergrößerungsfaktor 630. (A) ohne Xylose, (B) mit Xylose im LB-Medium.

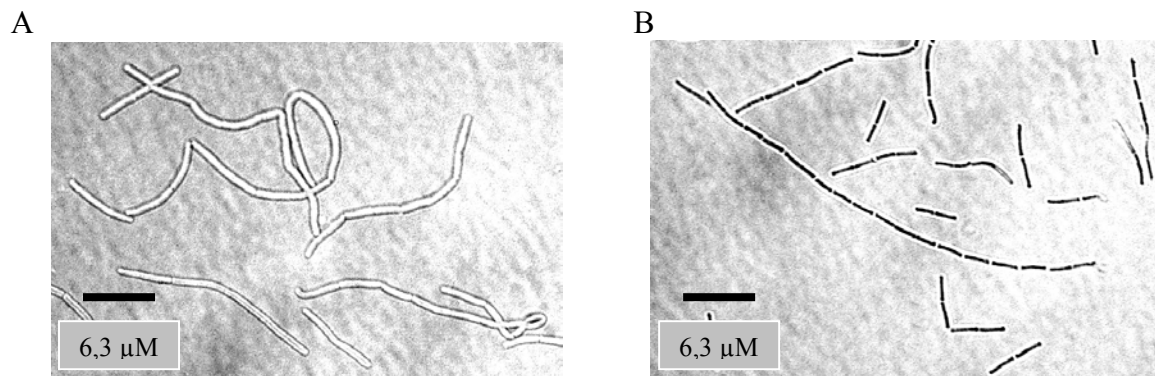


Abb. 10: Mikroskopische Aufnahme von *B. subtilis* WW01.

DIC-Optik. Optischer Vergrößerungsfaktor 630. (A) ohne Xylose, (B) mit Xylose im LB-Medium.

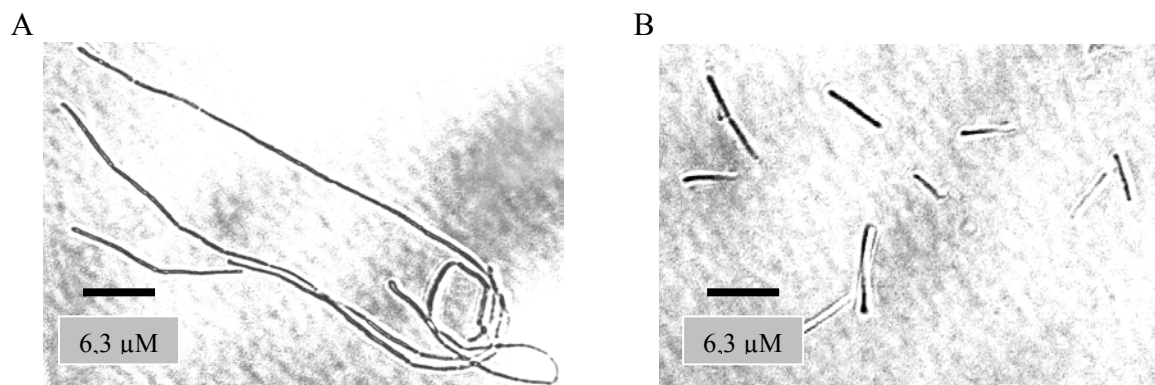


Abb. 11: Mikroskopische Aufnahme von *B. subtilis* KMΔ01.

DIC-Optik. Optischer Vergrößerungsfaktor 630. (A) ohne Xylose, (B) mit Xylose im LB-Medium.

In Abbildung 9 A und B sind Zellen vom Wildtypstamm *B. subtilis* 1012 zu sehen. Er zeigt weder mit noch ohne Xylose filamentöses Wachstum. Das gleiche Bild war aber auch bei den Stämmen KM01-05 zu beobachten, weshalb auf gesonderte Bilder verzichtet wurde und das Ergebnis in Tabelle 8 dargestellt ist. Im Gegensatz dazu zeigt die *ftsH*-Nullmutante WW01 in An- und Abwesenheit von Xylose ein deutliches filamentöses Wachstum (Abb. 10 A und B). Ein vergleichbarer Phänotyp wurde für die Stämme KMΔ02-Δ05 beobachtet (Daten werden in Tab. 8 dargestellt, Bilder nicht gezeigt). Nur KMΔ01 zeigt eine andere Morphologie. Wie in Abbildung 11A zu sehen ist, wächst auch dieser Stamm in Abwesenheit von Xylose wie erwartet filamentös, da ja kein FtsH gebildet wird. Mit Xylose allerdings wird FtsH exprimiert, und da es sich hier um das Wildtyp-FtsH handelt, war dieser Phänotyp zu erwarten (Abb. 11B). Der Stamm KMΔ01 dient damit auch als Kontrolle, dass das regulierbare Expressionssystem an sich funktioniert und genügend FtsH gebildet wurde, um filamentöses Wachstum zu verhindern. Daher kann das filamentöse Wachstum der Stämme

KMΔ02-Δ05 in Anwesenheit von Xylose nicht auf zu geringe Mengen an FtsH zurückgeführt werden. Daraus folgt, dass die Punktmutationen in den Stämmen KMΔ02-Δ05 den selben filamentösen Phänotyp bewirken, wie er für die *ftsH*-Nullmutante bereits bekannt ist. Gleichzeitig zeigen dieselben Mutationen in den Stämmen KM02-05, die zusätzlich das Wildtyp-FtsH exprimieren, das für den Wildtyp typische stäbchenförmige Wachstum. Daher ist entweder der Komplex aus mutiertem- und Wildtyp-FtsH in der Lage den filamentösen Phänotyp zu verhindern, oder es entstehen keine gemischten Komplexe.

3.1.3 Vergleich der Sporulationsfrequenz der *ftsH*-Mutanten

Ein weiterer Phänotyp der *B. subtilis ftsH*-Nullmutante ist die Unfähigkeit zu sporulieren. Stattdessen beginnen die Zellen bereits kurze Zeit nach Eintritt in die stationäre Phase zu lysieren. Um herauszufinden, ob eines der mutierten *ftsH*-Allele allein oder zumindest in Kombination mit dem wildtypischen *ftsH* in der Lage ist, diesen Defekt zu kompensieren, wurde mit allen 10 Stämmen, *B. subtilis* 1012, WW01 und als *ftsH*-unabhängige Negativkontrolle *B. subtilis* AS10 (*spo0A::Tn917*) ein Sporulationstest durchgeführt (2.4.2). Die Behandlung mit Lysozym, Hitze oder Chloroform sollten nur Sporen aber keine Zellen überstehen. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert und am nächsten Tag wurden die Kolonien gezählt. Der Stamm *B. subtilis* AS10 zeigte nach Behandlung mit Lysozym, Hitze oder Chloroform weniger als 0,1% Kolonien im Vergleich zu *B. subtilis* 1012, die Testbedingungen waren demnach korrekt. Die unbehandelten Proben wurden zur Ermittlung der Lebendzellzahl verwendet, welche zum Abgleich der Stämme untereinander notwendig war. Die Zahl der von *B. subtilis* 1012 nach der Behandlung mit Chloroform gebildeten Kolonien war die höchste und wurde gleich 100% gesetzt.

Tab. 9: Sporulationsfrequenz verschiedener *B. subtilis* Stämme

A

	Wachstum in Abwesenheit von Xylose		
	Lysozym	Hitze	Chloroform
1012	92%	97%	100%
AS10	< 0,1%	< 0,1%	< 0,1%
WW01	< 0,1%	< 0,1%	< 0,1%
KM01	93%	96%	98%
KM02	90%	96%	96%
KM03	91%	94%	99%
KM04	91%	93%	98%
KM05	90%	95%	95%
KMΔ01	< 0,1%	< 0,1%	< 0,1%
KMΔ02	< 0,1%	< 0,1%	< 0,1%
KMΔ03	< 0,1%	< 0,1%	< 0,1%
KMΔ04	< 0,1%	< 0,1%	< 0,1%
KMΔ05	< 0,1%	< 0,1%	< 0,1%-

B

	Wachstum in Anwesenheit von Xylose		
	Lysozym	Hitze	Chloroform
1012	93%	97%	100%
AS10	< 0,1%	< 0,1%	< 0,1%
WW01	< 0,1%	< 0,1%	< 0,1%
KM01	92%	98%	95%
KM02	92%	96%	93%
KM03	91%	97%	96%
KM04	92%	95%	98%
KM05	90%	96%	98%
KMΔ01	93%	97%	99%
KMΔ02	< 0,1%	< 0,1%	< 0,1%
KMΔ03	< 0,1%	< 0,1%	< 0,1%
KMΔ04	< 0,1%	< 0,1%	< 0,1%
KMΔ05	< 0,1%	< 0,1%	< 0,1%

Aus Übernachtskulturen der verschiedenen Stämme in Sporulations-Medium (DS) wurden je 50 ml DS-Medium mit und ohne 5% Xylose auf eine OD₅₇₈ von 0,05 inokuliert und bei 37°C inkubiert wurden. 36 Stunden nach Erreichen der stationären Phase wurden Proben genommen und unbehandelt oder nach Behandlung mit Lysozym, Hitze oder Chloroform in verschiedenen Verdünnungsstufen auf LB-Platten ausgestrichen. Die unbehandelten Proben wurden zur Ermittlung der Lebendzellzahl verwendet, welche zum Abgleich der Stämme untereinander notwendig war. Die Zahl der von *B. subtilis* 1012 nach der Behandlung mit Chloroform gebildeten Kolonien war die höchste und wurde gleich 100% gesetzt.

Wie man den Tabellen 9A und B entnehmen kann, verhalten sich die Stämme *B. subtilis* 1012 und WW01 wieder wie erwartet. *B. subtilis* 1012 sporuliert unabhängig vom Xylose-Gehalt des Mediums, während WW01 in beiden Fällen keine Sporen bilden kann. Werte kleiner 0,1% werden auf einzelne Zellen zurückgeführt, welche die Behandlung mit Lysozym, Hitze oder Chloroform überlebt haben, da diese selbst beim Stamm *B. subtilis* AS10 auftraten, der als Negativkontrolle diente. Auch auf die Stämme KM01-05 hat die Xylose keine ersichtliche Wirkung, sie sporulieren mit oder ohne Xylose wie der Wildtyp. Die in Anwesenheit von Xylose gebildeten zusätzlichen FtsH-Proteine, unverändertes FtsH01 oder mutierte FtsH02-05, beeinflussen die Sporulationsfrequenz nicht.

Bei den Stämmen KMΔ02-Δ05 verhält es sich ähnlich, die Xylose im Medium hat keine Auswirkungen, nur dass sich diese Stämme wie WW01 verhalten und keine Sporen bilden. Die Ausnahme bildet wieder der Stamm KMΔ01, der ohne Xylose nicht sporuliert, mit Xylose aber wieder sein wildtypisches FtsH01 exprimiert und damit dieselbe Sporulationsfrequenz wie der Wildtyp erreicht.

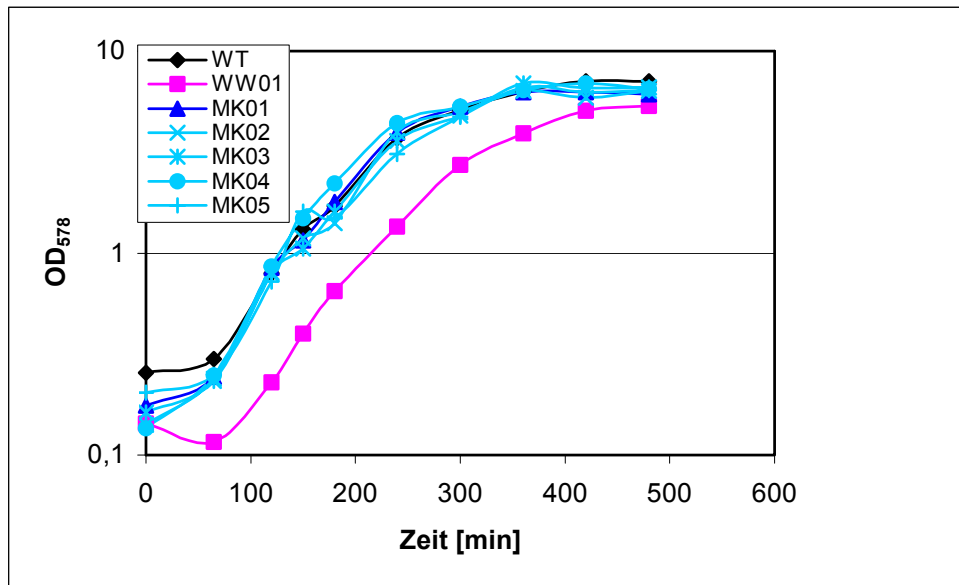
Das Ergebnis ist also mit dem der morphologischen Untersuchung des Wachstums in der exponentiellen Phase vergleichbar. Wenn in den Stämmen KM02-05 gemischte Komplexe aus Wildtyp- und mutiertem-FtsH entstehen, so haben sie keinen negativen Einfluss auf die Sporulationsfrequenz. Hingegen bewirken die Mutationen in ATPase- und Zink-Bindungsdomäne von FtsH eine Sporulationsdefizienz, wie sie auch bei der *ftsH*-Nullmutante zu beobachten ist.

3.1.4 Wachstumsverhalten der *ftsH*-Mutanten unter Standardbedingungen

Nachdem die Mutanten hinsichtlich ihrer Auswirkung auf die Morphologie untersucht wurden, sollten sie nun mit weiteren bekannten Phänotypen der *ftsH*-Nullmutante verglichen werden, die im Wachstumsverhalten beobachtet wurden. Unter Standardbedingungen (LB-Medium, 37°C) ist der Stamm WW01 unauffällig (Deuerling *et al.*, 1997), er hat eine etwas längere Lag-Phase als der Wildtyp, falls die Vorkultur die stationäre Phase schon erreicht hatte.

Dieser Versuch sollte zeigen, ob die Stämme KM01-05 und KMΔ01-Δ05 irgendwelche Auffälligkeiten unter Standardbedingungen zeigen würden. Dazu wurden Wachstumskurven (2.4.1) der Stämme KM01-05, KMΔ01-Δ05, *B. subtilis* 1012 und WW01 in LB-Medium mit und ohne Xylose bei 37°C bis zum Erreichen der stationären Phase aufgezeichnet.

A



B

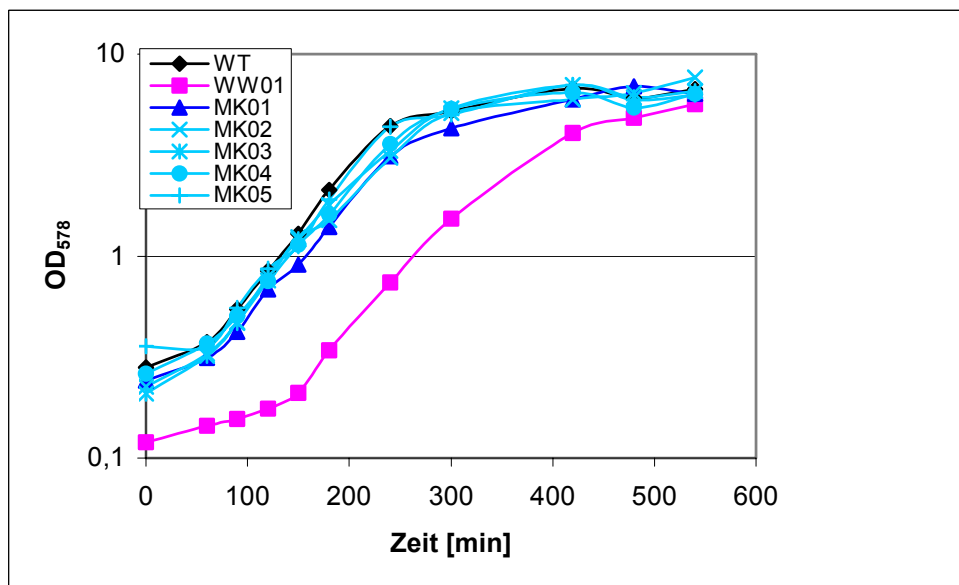


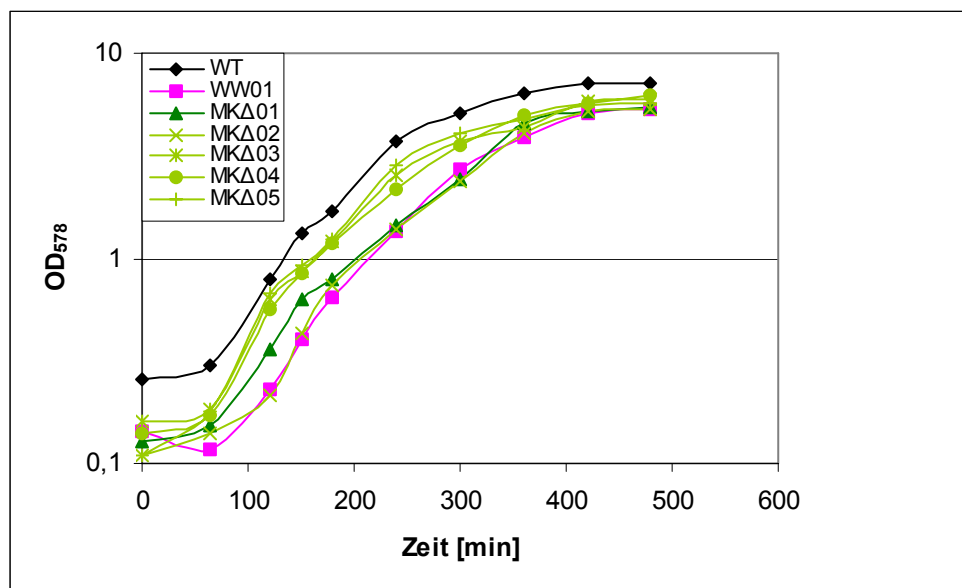
Abb. 12: Wachstumskurven der Stämme KM01-05 unter Standardbedingungen. Von den Stämmen KM01-05 und *B. subtilis* 1012 und WW01 als Kontrollen wurden Übernachtskulturen angelegt, aus denen am nächsten Morgen je 50 ml LB-Medium ohne (A) und mit (B) 1% Xylose mit 0,5 ml inokuliert und bei 37°C inkubiert wurden. In regelmäßigen Abständen wurden Proben genommen und die OD_{578} bestimmt, aus den halblogarithmisch aufgetragenen Werten konnten die Wachstumskurven erstellt werden.

In den Abbildungen 12A und B lässt sich kein abweichendes Wachstumsverhalten erkennen. Wie bereits beschrieben, kann *B. subtilis* das Fehlen von FtsH während des exponentiellen Wachstums unter Standardbedingungen kompensieren, ohne dass ein Phänotyp zu beobachten

wäre. Auch bei den Stämmen KM01-05, bei denen es durch die Xylose im Medium zu einer verstärkten Expression von FtsH kommt, ist nicht einmal für KM01, der das wildtypische Allel trägt, eine Abweichung zu erkennen. Weder die Abwesenheit von FtsH noch dessen Überproduktion beeinträchtigen das Wachstum von *B. subtilis* unter Standardbedingungen signifikant.

Von Interesse in diesem Versuch war vor allem, ob die Überproduktion von FtsH Auswirkungen auf das Wachstum haben würde. Denn es war nicht zu erwarten, dass eine Modifikation der Aktivität von FtsH durch die Bildung von gemischten Komplexen in den Stämmen KM02-05 (Tab. 7) Auswirkungen in diesem Versuch zeigen würden. Die Annahme beruht darauf, dass auch in der *ftsH*-Nullmutante unter diesen Versuchsbedingungen kein abweichender Phänotyp zu erkennen ist und wird durch die Abbildungen 12A und B bestätigt. Die Überproduktion von FtsH ruft ebenfalls keinen erkennbaren Phänotyp hervor (Abb. 12B: MK01), sie hat also unter den gewählten Bedingungen weder einen positiven noch einen negativen Effekt auf die Zelle.

A



B

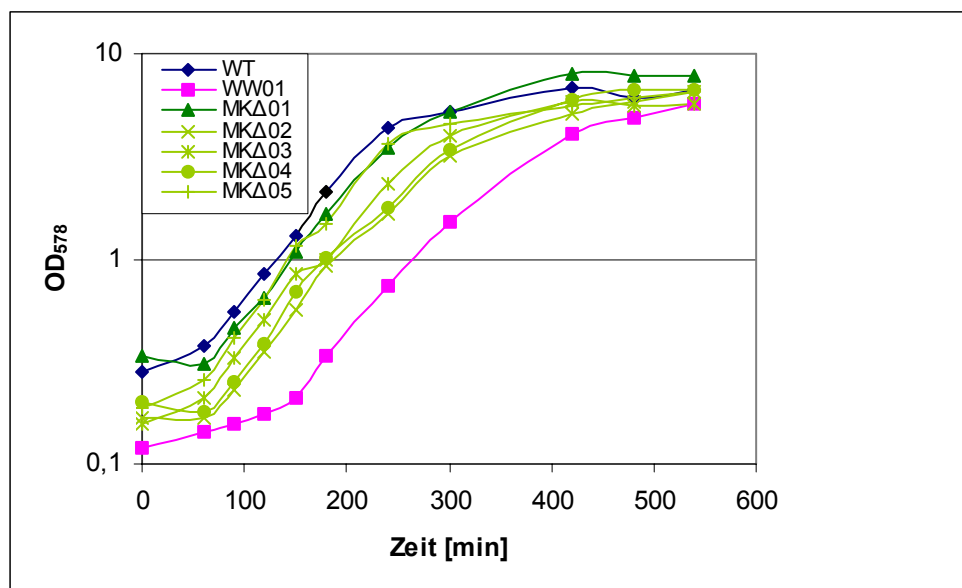


Abb. 13: Wachstumskurven der Stämme KMΔ01-Δ05 unter Standardbedingungen.

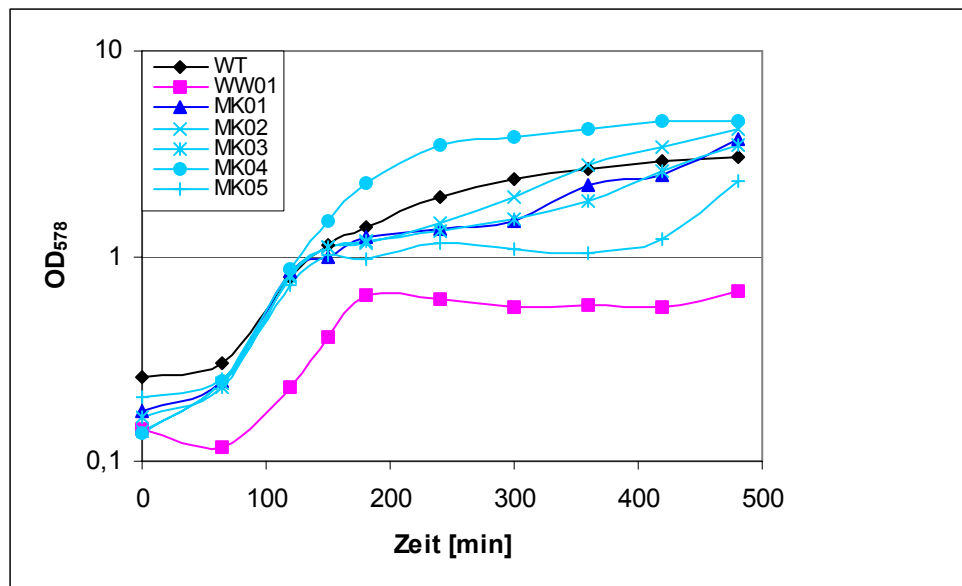
Es wurde das gleich Protokoll wie im vorherigen Versuch verwendet (Abb. 12).

Auch im Wachstum der Stämme KMΔ01-Δ05 zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (Abb. 13A und B). Wie bereits beschrieben, kann *B. subtilis* das Fehlen von FtsH während des exponentiellen Wachstums unter Standardbedingungen kompensieren, ohne daß ein Phänotyp zu beobachten wäre. Damit war sicher zu erwarten, dass sich die Stämme ohne Xylose (Abb. 13A) unauffällig verhalten würden, da in diesem Fall kein FtsH exprimiert wird und es sich faktisch um *ftsH*-Nullmutanten handelt. Aber auch mit Xylose sollte sich keine signifikante Abweichung ergeben, denn die Punktmutationen im *ftsH*-Gen sollten entweder zu einer Inaktivierung der ATPase- oder Protease-Domäne, bzw. zu einer Modifikation von deren Aktivität führen. Da der Vergleich von *B. subtilis* 1012 und WW01 jedoch zeigt, dass unter den gewählten Bedingungen keine dieser Aktivitäten von FtsH eine Auswirkung auf den Phänotyp hat, sollten hier auch die Punktmutationen keinen Einfluss auf das Wachstum haben.

3.1.5 Wirkung eines Hitzeschocks auf *ftsH*-Mutanten

Unter Standardbedingungen zeigen die zehn *ftsH*-Mutanten wie WW01 keinen Phänotyp während der exponentiellen Wachstumsphase. Wie aber reagieren sie auf einen Hitzeschock? Beim Stamm *B. subtilis* WW01 führt er zu einem Wachstums-Arrest (Deuerling *et al.*, 1997). Um dies herauszufinden, wurden wiederum Wachstumskurven (2.4.1) der Stämme KM01-05, KMΔ01-Δ05, *B. subtilis* 1012 und WW01 in LB-Medium mit und ohne Xylose bei 37°C bis zum Erreichen der stationären Phase aufgezeichnet. Diesmal wurden sie aber bei Erreichen einer OD₅₇₈ von 0,8 einem Hitzeschock auf 50°C ausgesetzt. Damit sollte die untersucht werden, ob FtsH bei der Hitzeschockantwort eventuell nur die ATPase- oder Protease-Aktivität benötigt.

A



B

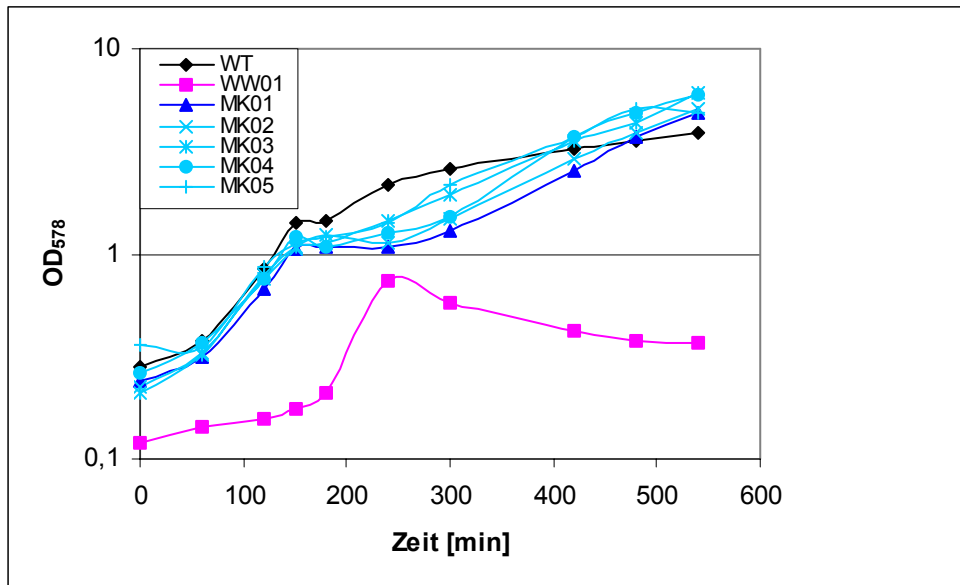
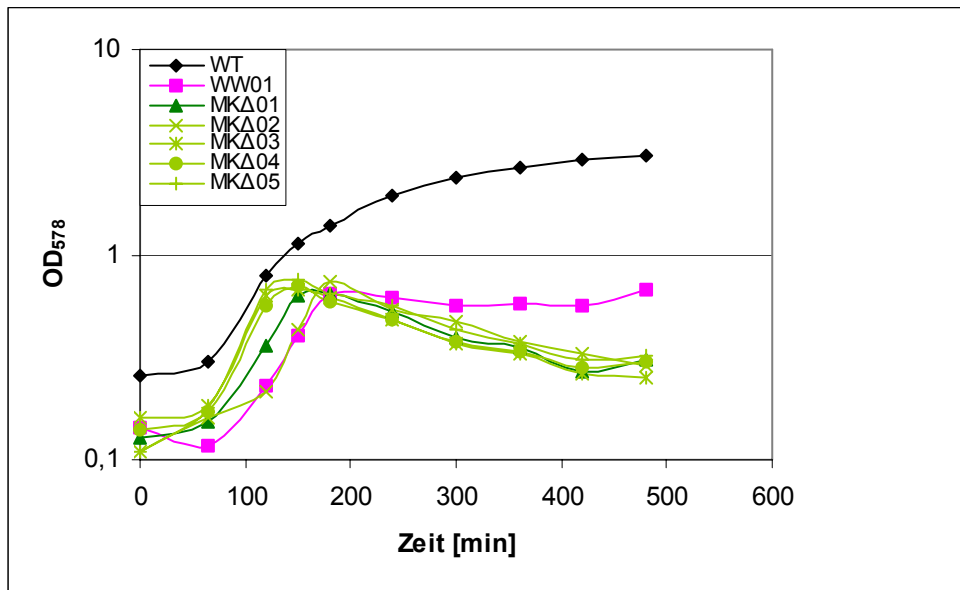


Abb. 14: Wachstumskurven der Stämme KM01-05 nach Hitzeschock. Die Stämme KM01-05, *B. subtilis* 1012 und WW01 wurden mit 0,5 ml aus Übernachtskulturen in je 50 ml LB-Medium ohne (A) und mit (B) 1% Xylose inokuliert und bei 37°C inkubiert. Beim Erreichen einer OD₅₇₈ von 0,8 wurde ein Hitzeschock auf 50°C gesetzt und die Wachstumskurven bis zum Erreichen der stationären Phase aufgezeichnet.

Die Abbildungen 14A und B zeigen, dass *B. subtilis* WW01 wie beschrieben das Wachstum nach einem Hitzeschock zumindest für den gemessenen Zeitraum einstellt, während sich *B. subtilis* 1012 nach kurzer Zeit erholt und weiter wächst. Die Stämme KM01-05 verhalten sich wie der Wildtyp und erholen sich wieder von der Temperaturerhöhung, es sieht sogar so aus, als ob die Stämme sich im Xylose-haltigen Medium etwas schneller erholen würden (Abb. 14B). Ohne Xylose war zu erwarten, dass sich die Stämme gleich dem Wildtyp verhielten, da es sich bei ihnen faktisch um den Wildtyp handelt, wenn die ektopisch integrierten *ftsH*-Allele nicht exprimiert werden. Die kürzere Erholungsphase nach dem Hitzeschock mit Xylose könnte durch die konstant höhere Konzentration an FtsH zu erklären sein, denn normalerweise wird FtsH ja erst nach dem Hitzeschock dreifach verstärkt exprimiert (Deuerling *et al.*, 1997). Hierbei ist kein Unterschied zu erkennen, ob es sich nur um überexprimiertes FtsH (Abb. 14B: MK01) oder um überexprimierte mutierte-FtsH's handelt. Auf jeden Fall kann ausgeschlossen werden, dass die Überexpression der mutierten FtsH's einen negativen Einfluss hat.

A



B

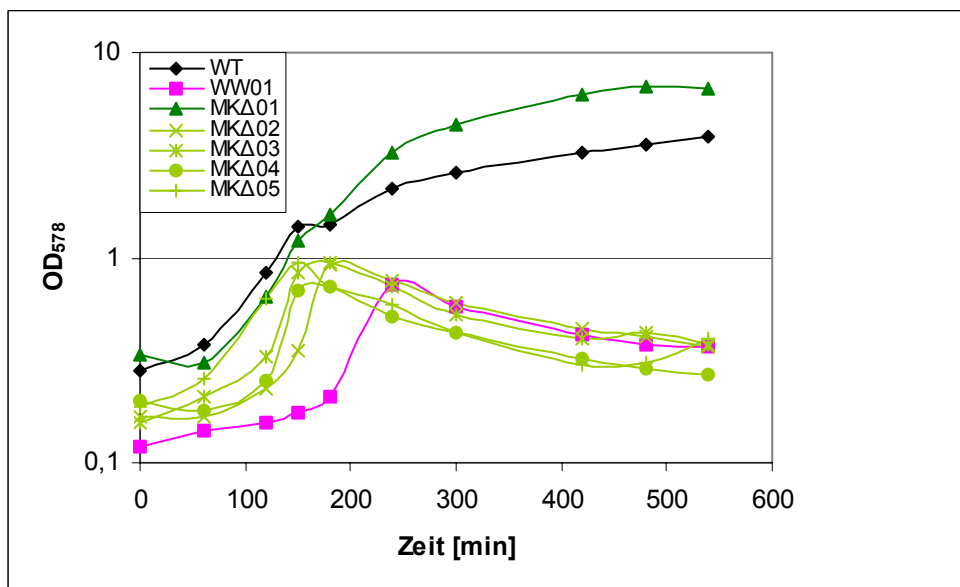


Abb. 15: Wachstumskurven der Stämme KMΔ01-Δ05 nach Hitzeschock.

Es wurde das gleich Protokoll wie im vorherigen Versuch verwendet (Abb. 14).

Im Gegensatz zu den Stämmen KM01-05 können sich KMΔ01-Δ05 nach dem Hitzeschock im Medium ohne Xylose zumindest für den gemessenen Zeitraum nicht mehr erholen und stellen das Wachstum ein (Abb. 15A), wie bei WW01 beobachtet. Auch wenn dem Medium Xylose zugesetzt wurde, kann sich nur der Stamm KMΔ01 wieder erholen, dafür aber sogar besser als

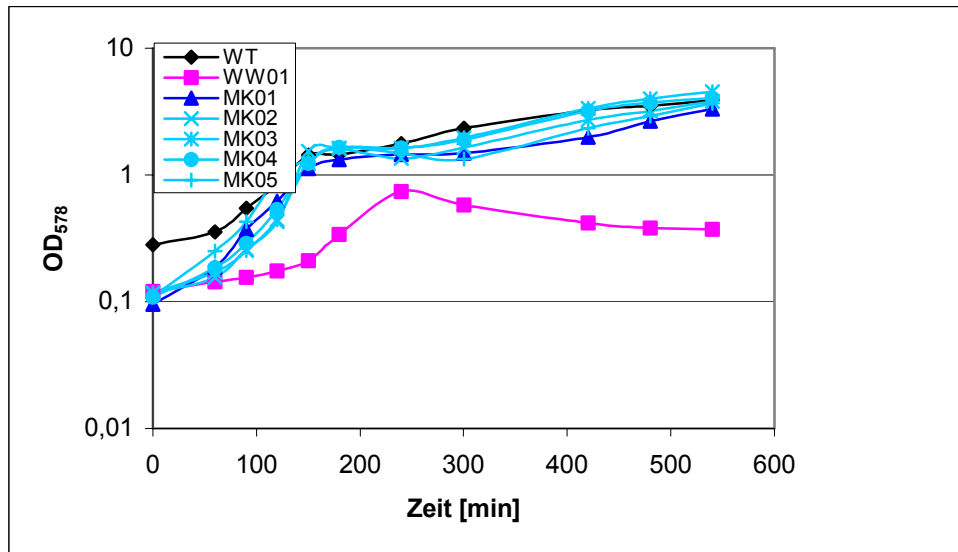
der Wildtyp (Abb. 15B). Die Stämme KM Δ 02- Δ 05 hingegen können nicht von der Xylose profitieren.

Da die Stämme KM Δ 02- Δ 05 ohne Xylose einer *ftsH*-Nullmutante entsprechen, verhielten sie sich beim Hitzeschock ohne Xylose auch wie erwartet (Abb. 15A). Dass sie sich aber auch mit Xylose nicht erholen können, deutet darauf hin, dass FtsH sowohl seine ATPase- als auch seine Protease-Aktivität braucht, um seine Funktion in der Hitzeschockantwort erfüllen zu können. Die beobachtete verkürzte Erholungsphase von KM Δ 01 mit Xylose korreliert mit dem Ergebnis des vorherigen Versuchs (Abb. 14B: MK01-05). Es lässt sich also vermuten, dass die erhöhte Anwesenheit von FtsH schon vor dem Hitzeschock die Regeneration beschleunigt.

3.1.6 Untersuchung des Wachstumsverhaltens der *ftsH*-Mutanten nach einem osmotischen Schock

Auch auf einen osmotischen Schock reagieren *B. subtilis ftsH*-Stämme wie WW01 sehr empfindlich mit einem Wachstumsarrest, während der Wildtyp, wenn auch langsamer, weiterwächst (Deuerling *et al.*, 1997). Um zu testen, wie sich die Stämme KM01-05 und KM Δ 01- Δ 05 nach einem osmotischen Schock verhalten, wurden wiederum Wachstumskurven (2.4.2) der 10 Stämme, *B. subtilis* 1012 und WW01 in LB-Medium mit und ohne 1% Xylose bei 37°C bis zum Erreichen der stationären Phase aufgezeichnet. Beim Erreichen einer OD₅₇₈ wurde ein osmotischer Schock auf 1,2 M NaCl gesetzt. So sollte festgestellt werden, ob auch zur Bewältigung des osmotischen Schocks sowohl die ATPase- als auch die Protease-Aktivität gebraucht werden.

A



B

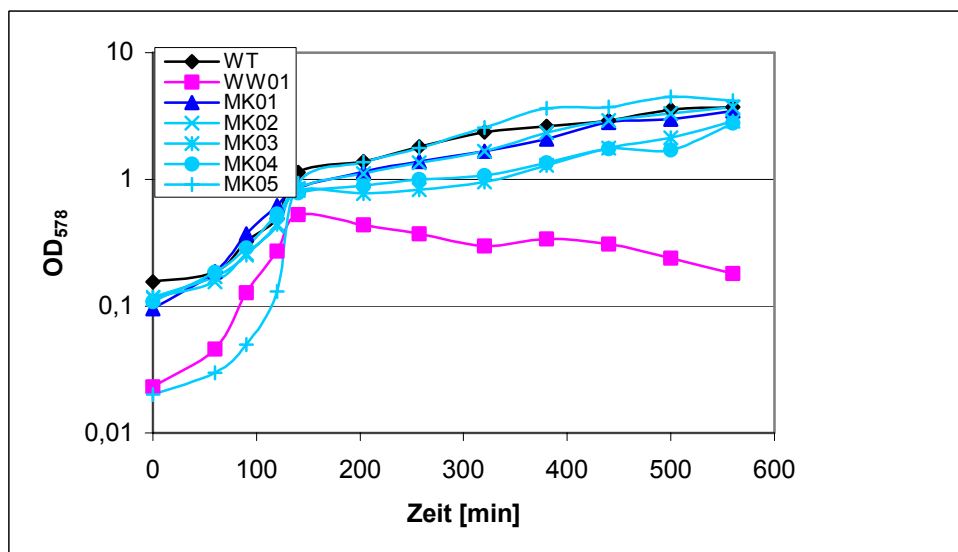
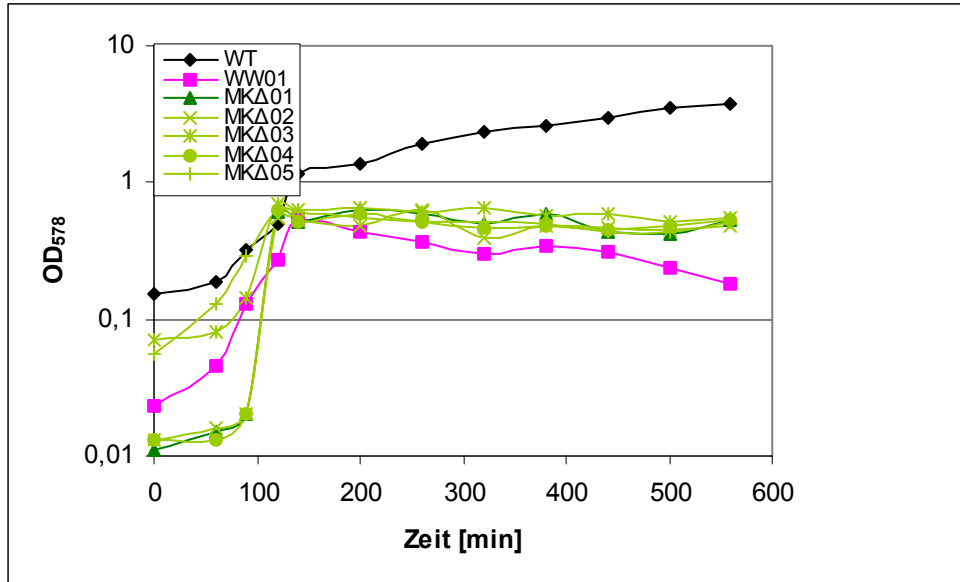


Abb. 16: Wachstumskurven der Stämme KM01-05 nach osmotischem Schock. Die Stämme KM01-05, *B. subtilis* 1012 und WW01 wurden mit 0,5 ml aus Übernachtskulturen in je 50 ml LB-Medium ohne (A) und mit (B) 1% Xylose inokuliert und bei 37°C inkubiert. Beim Erreichen einer OD_{578} von 0,8 wurde ein osmotischer Schock auf 1,2 M NaCl gesetzt und die Wachstumskurven bis zum Erreichen der stationären Phase aufgezeichnet.

In den Abbildungen 16A und B ist zu erkennen, dass beim Stamm *B. subtilis* WW01 nach dem osmotischen Schock wie beschrieben ein Wachstumsarrest auftritt. *B. subtilis* 1012 hingegen wächst nach kurzer Zeit langsam weiter, wie auch die Stämme KM01-05. Allerdings ist bei diesen Stämmen, im Gegensatz zu den Kontrollstämmen, ein kleiner Unterschied im Wachstumsverhalten ohne und mit Xylose zu beobachten. Ohne Xylose im Medium zeigen sie eine Lackphase wie der Wildtyp (Abb. 16A), dem sie in diesem Fall ja auch entsprechen. Mit Xylose im Medium, und somit erhöhter FtsH-Synthese, jedoch verkürzt sich die Lag-Phase (Abb. 16B). Die Stämme *B. subtilis* KM01, 02 und 05 weisen sogar nahezu keinen Wachstumsstopp auf und wachsen direkt langsamer weiter. Diese schnellere Erholung stimmt mit der Beobachtung aus dem vorhergehenden Hitzeschock-Versuch überein (Abb. 15A und B). Die mutierten FtsH-Proteine haben also auch hier keinen negativen Einfluss, sondern wirken sich im Gegenteil sogar positiv aus.

A



B

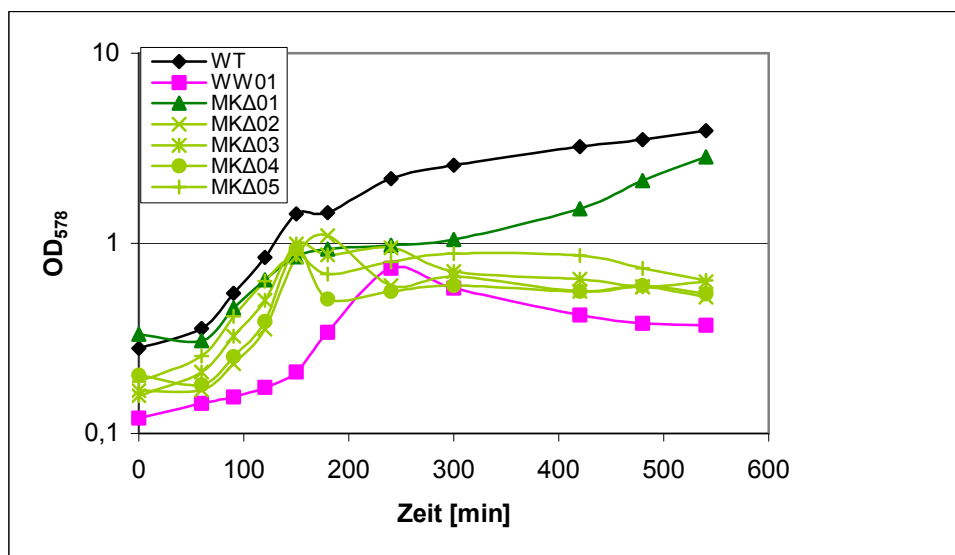


Abb. 17: Wachstumskurven der Stämme KMΔ01-Δ05 nach osmotischem Schock.

Es wurde das gleich Protokoll wie im vorherigen Versuch verwendet (Abb. 16).

Die Stämme KMΔ01-Δ05 verhalten sich ohne Xylose wiederum wie *ftsH*-Nullmutanten, denen sie faktisch ja auch entsprechen, und gehen nach einem osmotischen Schock in Wachstumsarrest (Abb. 17A). Auch mit Xylose im Medium können sich die Stämme KMΔ02-Δ05 nach dem Schock nicht mehr erholen (Abb. 17B), wie es auch schon beim Hitzeschock-Experiment beobachtet wurde. Der Stamm KMΔ01, der das wildtypische FtsH unter der Kontrolle des Xylose-induzierbaren Promotors trägt, verhält sich mit Xylose erwartungsgemäß ähnlich wie *B. subtilis* 1012 und wächst nach einem kurzen Wachstumsstopp langsam weiter.

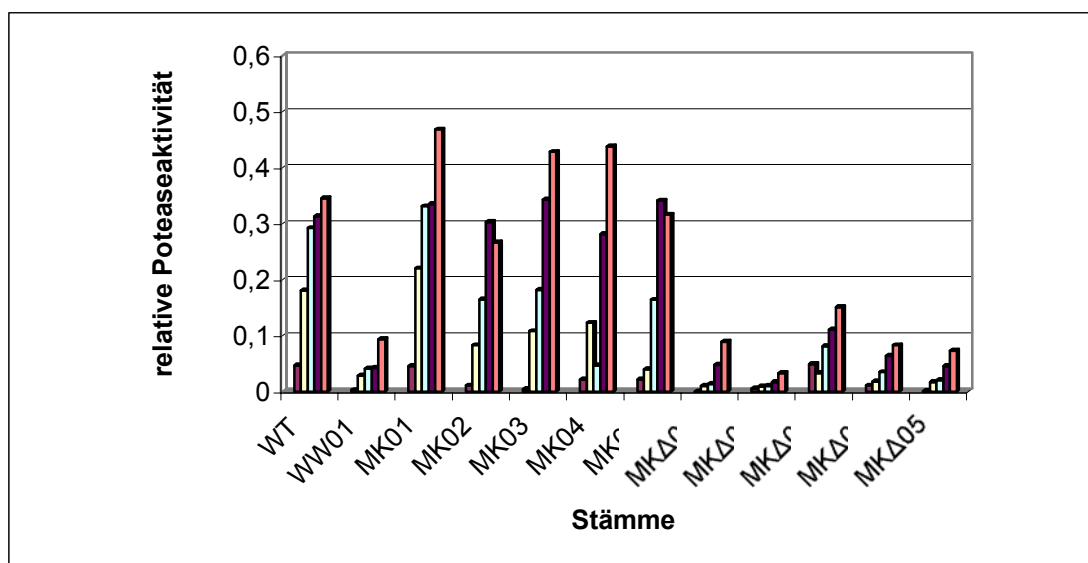
Demnach werden wohl auch für die Bewältigung des osmotischen Schocks sowohl die ATPase- als auch die Protease-Aktivität benötigt. Zudem sind die mutierten FtsH-Proteine anscheinend nicht in der Lage, aktive Komplexe zu bilden.

3.1.7 Untersuchung der Subtilisin-Sekretion der Stämme KM01-05 und KM Δ 01- Δ 05

Wenn *B. subtilis* in die stationäre Phase übergeht und die Nährstoffe knapp werden, gibt das Bakterium Exoproteasen in das Medium ab, um neue Nährstoffquellen für sich zu erschließen (Strauch *et al.*, 1989). Eine dieser Proteasen ist Subtilisin, von der festgestellt wurde, dass ihre Konzentration im Medium in *ftsH*-Knockouts deutlich geringer ist (Deuerling *et al.*, 1997). Dies liegt daran, dass wahrscheinlicher die Produktion herabgesetzt wird, da kaum *aprE* exprimiert wird, welches für Subtilisin kodiert. Der Schluss liegt nahe, da *aprE* von AbrB negativ reguliert und die AbrB-Synthese in *ftsH*-Nullmutanten beim Eintritt in den Sporulationszyklus nicht abgeschaltet wird (Valle und Ferrario, 1989).

In diesem Versuch soll untersucht werden, ob eine der *ftsH*-Mutanten diesen Defekt kompensieren kann. Dazu wurden wiederum Wachstumskurven der 10 Stämme, *B. subtilis* 1012 und WW01 in LB-Medium mit und ohne 1% Xylose bei 37°C, aufgenommen. Zu den Zeitpunkten $t = -1, 0, 1, 2$ und 3 ($t = 0$ ist der Übergang in die stationäre Phase) wurden Proben entnommen und gleicher Zellzahl entsprechend (durch Verdünnung erreicht) abzentrifugiert. Der Überstand wurde nach einer Proteinbestimmung für den Enzym-Test verwendet (2.4.3). Das Subtilisin in den Proben spaltet das zugegebene Substrat Hide-Powder-Azure wodurch ein Farbkomplex freigesetzt wird, der das Medium anfärbt. Nach der Inkubation und der Abzentrifugation der Schwebeteilchen kann nun die Menge des freigesetzten Farbstoffs und somit die Menge an umgesetztem Substrat photometrisch bei OD₅₉₅ ermittelt werden. Daraus ergibt sich dann die relative Aktivität der Protease.

A



B

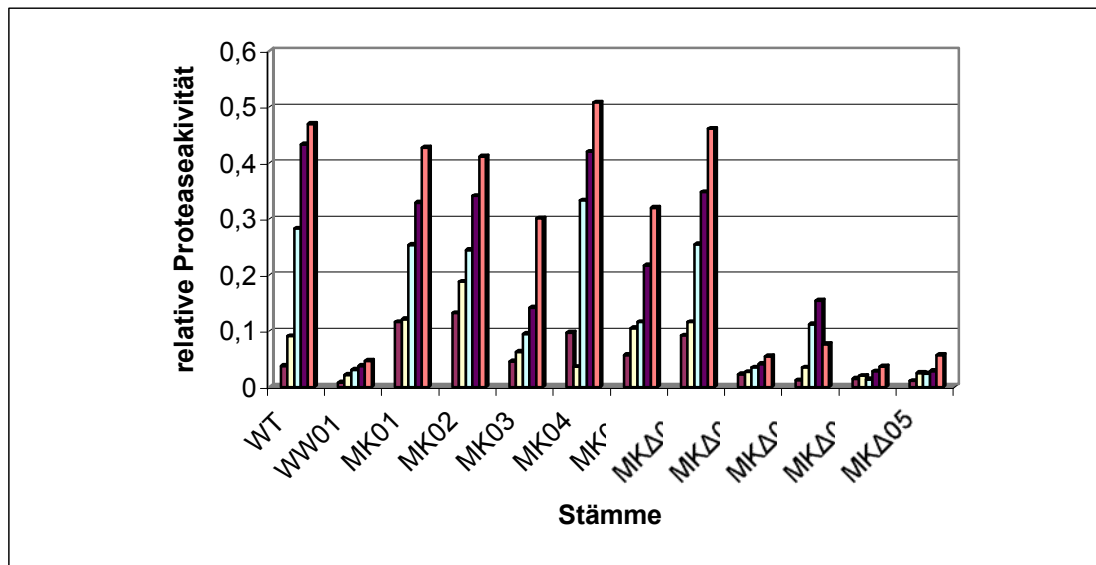


Abb. 18: Aktivität von Subtilisin im Medium der Stämme KM01-05 und KMΔ01-Δ05 beim Übergang in die stationäre Phase. Mit den Überständen der Stämme KM01-05, KMΔ01-Δ05, *B. subtilis* 1012 und *B. subtilis* WW01 zu den Zeitpunkten $t = -1, 0, 1, 2$ und 3 wurde ein Subtilisintest durchgeführt (2.4.3). Dazu wurden gleiche Mengen zum Reaktionspuffer mit dem Substrat Hide-Powder-Azure gegeben, und der entstehende Farbkomplex ermöglichte die Menge an umgesetztem Substrat photometrisch bei einer OD_{595} zu messen. Daraus ließ sich die Proteaseaktivität ermitteln. In Abbildung 18A sind die Ergebnisse ohne Xylose und in 18B mit Xylose im Wachstumsmedium dargestellt.

Wie erwartet zeigt der Wildtyp eine bis zu 10fach höhere Proteaseaktivität wie WW01 (Abb. 18A und B). Die Proteaseaktivität der Stämme KM01-05 verhält sich ohne und mit Xylose so wie die von *B. subtilis* 1012. Auf Grund der vorhergehenden Versuche hätte man aber erwarten können, dass die Aktivität mit Xylose gegenüber der ohne erhöht sein würde, da durch die erhöhte Menge an FtsH auch mehr *aprE* exprimiert werden sollte und somit Subtilisin synthetisiert (Falle und Ferrario, 1989). Die geringe zu erwartende Steigerung der Proteaseaktivität war aber vielleicht auch durch die leichte Ungenauigkeit der Methode zur Subtilisin-Bestimmung nicht messbar.

Die Stämme KMΔ02-Δ05 sind wieder vergleichbar mit *B. subtilis* WW01. Einzig KMΔ01 wird deutlich davon beeinflusst, ob sich Xylose im Medium befindet oder nicht. Ohne Xylose ist er wieder mit WW01 vergleichbar (Abb. 18A) und mit entspricht er dem Wildtyp (Abb. 18B). Auffällig ist lediglich, dass der Stamm KMΔ03 sowohl mit als auch ohne Xylose eine 2-3fach gesteigerte Aktivität gegenüber WW01 und den anderen Δ-Stämmen aufweist. Ansonsten stimmen die Resultate sehr gut mit den bereits ermittelten Daten überein, dass die mutierten FtsH-Proteine allein keinen aktiven Komplex bilden können.

3.1.8 Untersuchung der ATPase Aktivität der Proteine FtsH01-05

Nachdem die Stämme KM Δ 02- Δ 05 sich in allen bisherigen Tests wie eine *ftsH*-Nullmutante verhalten haben und in den Stämmen KM02-05 nur einen schwachen Effekt vermittelten, sollte die Wirkung der Aminosäureaustausche auf die ATPase-Aktivität der Proteine selbst untersucht werden. Dazu wurden *ftsH01-05* in den Vektor pGEX2T inkloniert und in den *E. coli*-Stamm A8926 transformiert (2.7.1.1) Dieser Vektor besitzt einen IPTG-induzierbaren Promotor und die Sequenz der Glutathion-S-Transferase (GST) aus *Schistosoma japonicum*. Beim Einbau von FtsH wird diese an den N-Terminus des Gens angefügt, wodurch sich das Molekulargewicht um 26 kDa für den GST-Tag erhöht. Das System ermöglichte die Überproduktion der FtsH-GST Fusionsproteine und deren native Aufreinigung (2.6.7) (Parker *et al.*, 1990). Dazu wurden von den *E. coli*-Stämmen mit dem jeweiligen Plasmid aus einer Übernachtskultur 300 ml LB Medium auf eine OD₆₀₀ von 0,05 inokuliert und bei 30°C inkubiert. Bei einer optischen Dichte von 0,4-0,5 wurde 1 mM IPTG zugegeben und die Kulturen bei 20°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Zellen mittels Ultraschall aufgeschlossen (1.6.7), damit die Proteine an die an die Glutathion-Agarose binden konnten. Nach Inkubation und mehreren Waschschritten erfolgte die Elution mit einem Elutionspuffer, der 50 mM Glutathion enthielt. Die so gewonnenen Proteine mussten noch in einen phosphatfreien Puffer umgepuffert werden (1.6.9), bevor sie für den ATPase-Test (1.6.10) eingesetzt werden konnten. Die Proteinkonzentration wurde nach der Methode von Bradford gemessen und die eluierten Proteine auf einem 12%igen SDS-Gel analysiert (nicht gezeigt).

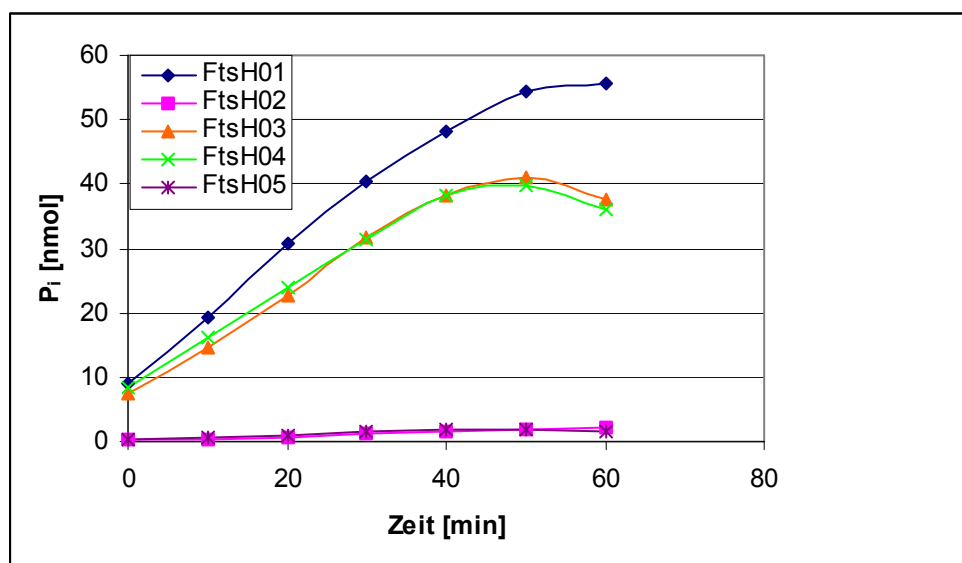


Abb. 19: ATPase-Test mit den Proteinen FtsH01-05. Es ist die aus ATP freigesetzte Menge an P_i [nmol] in Abhängigkeit von der Zeit aufgetragen. Die eingesetzten Konzentrationen an FtsH betrugen 21 nM, alle Messreihen sind in Bezug auf die spontane Hydrolyse von ATP korrigiert.

Die Mutation im Walker-Motiv der Protease FtsH von *B. subtilis* hat im *ftsH*-Homolog von *E. coli* zu einer Inaktivierung der ATPase-Aktivität geführt (Akiyama *et al.*, 1996a) und wurde mit der selben Intention eingeführt. Der ATPase-Test zeigt dann auch, dass die Proteine FtsH02 (Walker-A-Box) und FtsH05 (Walker-A-Box und Zinkbindungsmotiv) keine ATPase Aktivität mehr zeigen (Abb. 19), was in beiden Fällen auf die Mutation im Walker-Motiv zurückzuführen sein dürfte. Der Basenaustausch im *B. subtilis* FtsH führt also zum selben Ergebnis, wie der im *E. coli* FtsH.

Die Proteine FtsH03 (Zinkbindungsmotiv) und FtsH04 (Zinkbindungsmotiv) zeigen eine etwas geringere Aktivität als das Wildtyp-FtsH01 (Abb. 19). Sie haben also wie beabsichtigt ihre ATPase-Aktivität behalten, wenn auch mit leichten Einschränkungen, die aber keinen großen Einfluss auf Ergebnisse hätten haben können.

3.1.9 Untersuchung der Protease-Aktivität der Proteine FtsH01-05

Die Untersuchung der ATPase-Aktivität von FtsH01-05 hat ergeben, dass die Aminosäureaustausche den hierfür gewünschten Effekt hatten. Nun sollte noch geklärt werden, ob die Mutanten noch Protease-Aktivität aufweisen. Die Proteine wurden auf dieselbe Weise gewonnen wie für den ATPase-Test, nur mussten sie nicht umgepuffert werden.

Die in das Zinkbindungsmotiv von FtsH aus *B. subtilis* eingeführten Punktmutationen sollten die Protease-Aktivität ausschalten.

Um dies zu überprüfen wurden die Proteine in einem *in-vitro*-Ansatz mit einem α - und β -Caseingemisch (Sigma) inkubiert und auf den Abbau von β -Casein untersucht (1.6.8), welches ein Substrat für FtsH ist (Shotland *et al.*, 1997).

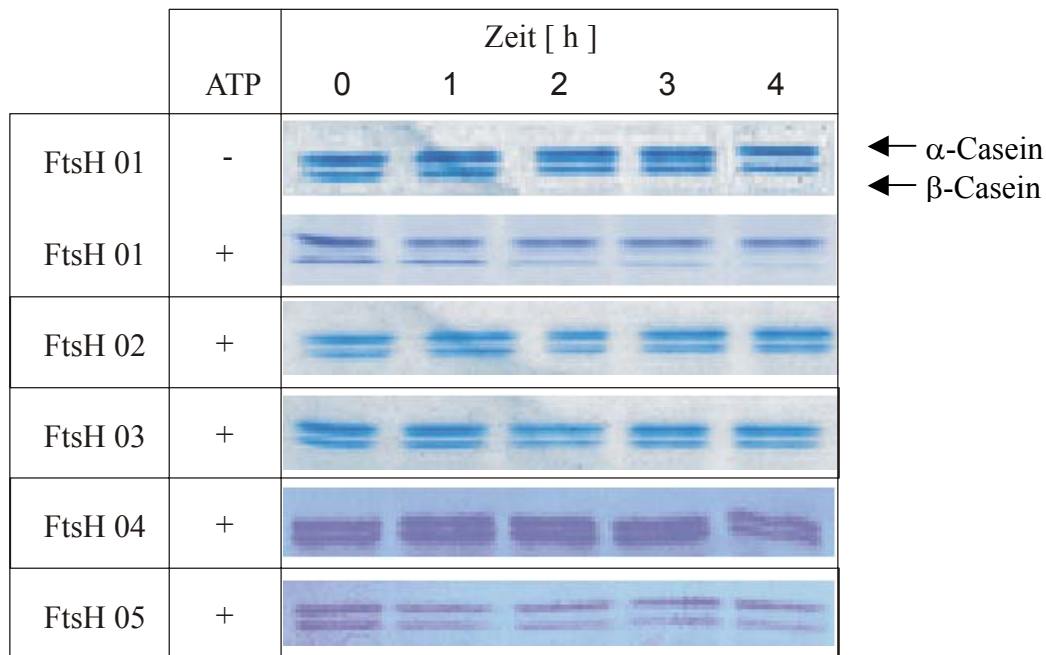


Abb. 20: Untersuchung der Protease-Aktivität von FtsH01-05. Die Proteine wurden auf dieselbe Weise gewonnen wie für den ATPase-Test. Die Proteine wurden in einem *in vitro* Ansatz mit einem α - und β -Caseingemisch (Sigma) inkubiert und auf den Abbau von β -Casein untersucht. Da es sich bei FtsH um eine ATP-abhängige Metalloprotease handelt, sind ATP und Zink bei diesem Versuch absolut notwendig. Zink ist in allen Puffern vorhanden, ATP musste separat zugegeben werden. Als Negativkontrolle wurde FtsH01 ohne ATP eingesetzt. Die jeweils obere Bande ist α -Casein, welches von FtsH nicht abgebaut werden kann und somit gleichzeitig als Ladungskontrolle wirkt, und die jeweils untere wird vom β -Casein gebildet, das ein Substrat für FtsH darstellt.

Als Negativkontrolle für den Protease-Test wurde das Protein FtsH ohne ATP eingesetzt, und β -Casein wurde nicht abgebaut (Abb. 20). Wird Casein mit FtsH in Gegenwart von ATP inkubiert, dann kommt es zum Abbau von β -Casein (Abb. 18).

Die FtsH-Mutanten Proteine FtsH02 bis FtsH05 hingegen zeigen keine Protease-Aktivität.

Die Mutationen im Zinkbindungsmotiv erzielen also die gewünschte Wirkung.

Die fehlende Aktivität bei FtsH02 erklärt sich daraus, dass FtsH auch seine ATPase-Aktivität benötigt, um als Protease wirken zu können. Und diese ist in FtsH02 nicht vorhanden, wie der vorhergehende Versuch gezeigt hat.

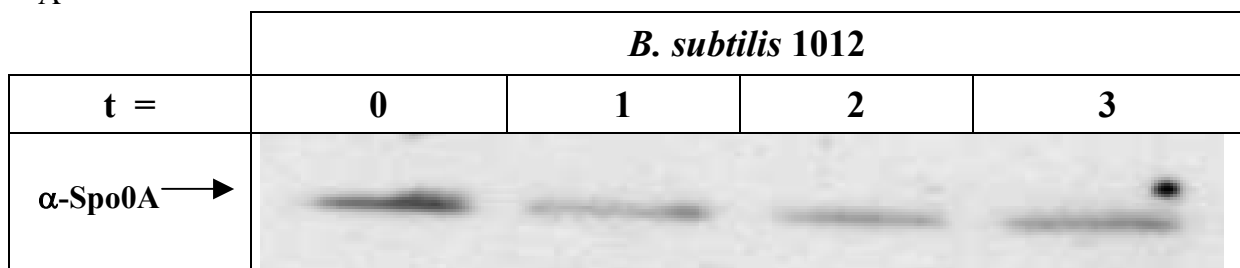
Die Auswirkungen von Mutationen in den hoch konservierten Motiven von FtsH scheinen also zwischen den verschiedenen Spezies übertragbar zu sein.

3.2 Sporulation

3.2.1 Der Sporulationsprozess von *B. subtilis* stoppt bei *ftsH*-Mutanten nicht bei der Bildung von Spo0A

Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit war die Suche nach der Stufe, in welcher der Sporulationszyklus in WW01 unterbrochen wird. Frühere Arbeiten deuteten darauf hin, dass es sich um die Bildung von Spo0A handeln könnte, da die Expression von *abrB* in *ftsH*-Nullmutanten bei Eintritt in die Sporulation nicht abgeschaltet und die Expression von AbrB durch Spo0A~P negativ reguliert wird (Strauch *et al.*, 1989). Daher wurden als erstes mit Hilfe von Anti-Spo0A-Antikörpern die Zellextrakte von *B. subtilis* 1012 und WW01 in den Phasen 0 bis 3 der Sporulation untersucht. Dazu wurden Wachstumskurven in LB-Medium bei 37°C aufgenommen und zu den Zeitpunkten $t = 0, 1, 2$ und 3 Proben genommen. Daraus wurden, wie in Abschnitt 2.6.2 beschrieben, denaturierte Zellextrakte gewonnen. Diese wurden mit Hilfe eines SDS-Polyacrylamidgels diskontinuierlich aufgetrennt, durch einen Western-Blot auf Nitrozellulose-Membran übertragen und mit Antikörpern gegen das Spo0A-Protein detektiert.

A



B

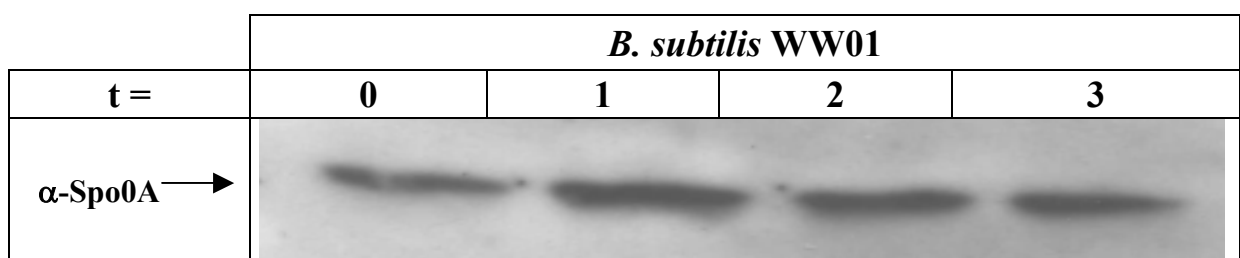


Abb. 21: Luminogramm der Western-Blot Analyse des Stammes *B. subtilis* 1012 unter Verwendung der Antikörper gegen Spo0A. Je 50 ml LB-Medium wurden aus Übernachtskulturen von *B. subtilis* 1012 und WW01 auf eine OD_{578} von 0,05 inokuliert und bei 37°C inkubiert. Es wurden Wachstumskurven aufgenommen, zu den Zeitpunkten $t=0, 1, 2$ und 3 wurden Proben genommen und daraus, wie in Abschnitt 3.5.2 beschrieben, denaturierte Zellextrakte gewonnen. Diese wurden, entsprechend gleicher Zellzahl, auf ein SDS-

Polyacrylamidgel geladen und diskontinuierlich aufgetrennt. Anschließend erfolgten ein Western-Blot und ein immunologischer Nachweis der an die Nitrozellulose-Membran gebundenen Proteine mit Antikörpern gegen das Spo0A-Protein.

In Abbildung 21A ist bei *B. subtilis* 1012 in den Phasen $t = 0$ bis $t = 3$ Spo0A zu erkennen. Die stärkste Expression findet in der Phase 0 statt und das macht auch Sinn, da Spo0A schließlich als Initiator der Sporulation gilt (Hoch 1993). Danach nimmt die Menge an Spo0A ab, verschwindet aber nicht völlig, da es auch in späteren Phasen der Sporulation noch gebraucht wird (Fujita und Losick, 2003).

In Abbildung 21B wird deutlich, dass es nicht zu einer Unterbrechung des Sporulationszyklus kommt, weil kein Spo0A gebildet wird. Auch im Stamm WW01 kann Spo0A von $t = 0$ bis $t = 3$ detektiert werden, aber anders als bei *B. subtilis* 1012, nimmt die Menge nicht ab, sondern bleibt ungefähr gleich. Dies ist ein erstes Indiz dafür, dass Sporulationsprozess nicht über die Phase $t = 0$ hinaus weiterläuft, da dann die Menge an Spo0A abnehmen müsste.

3.2.2 Die Sporulation in *ftsH*-Nullmutanten wird bei der Phosphorylierung von Spo0A unterbrochen

Da gezeigt werden konnte, dass der Sporulationsprozess von *B. subtilis* WW01 nicht unterbrochen wird, weil kein Spo0A vorhanden ist, wurde nun auf RNA-Ebene mit Hilfe von fünf Sonden und dem Vergleich von *B. subtilis* 1012 und *B. subtilis* WW01 versucht, den Punkt im Sporulationszyklus von *B. subtilis* WW01 zu ermitteln, an dem die Sporulation abbricht.


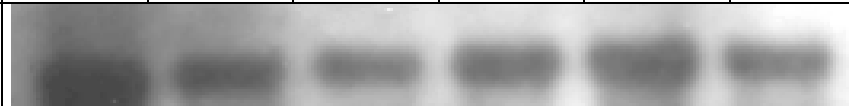








Die Hypothese war, dass die Phosphorylierung von Spo0A in Abwesenheit von FtsH nicht stattfindet und somit das Sporulations-Programm nicht gestartet wird, da dafür eine bestimmte Menge an Spo0A~P notwendig ist. Deshalb gilt Spo0A auch als Master-Regulator für den Eintritt in die Sporulation (Hoch 1993). Aktives Spo0A bewirkt zunächst eine Stimulation seiner eigenen Synthese und Phosphorylierung (Fujita und Sadaie, 1998). In Verbindung mit der RNA-Polymerase und dem Housekeeping-Sigmafaktor σ^A und dem alternativen Sigmafaktor σ^H induziert Spo0A~P die Gen-Transkription zu Beginn der Sporulation (Stragier und Losick, 1996; Piggot und Losick, 2002). Diese Transkription ist verantwortlich für die Remodulierung des Schwester-Chromosoms, für das Sporangium, in das Axialfilament (Pogliano *et al.*, 2002; Ben-Yehuda *et al.*, 2003) und für die Bildung eines asymmetrischen

Septums, dass das Sporangium in Vorspore und Mutterzelle teilt (Levin und Losick, 1996; Ben-Yehuda und Losick, 2002). Des weiteren ist Spo0A~P für die Synthese und Aktivierung der zellspezifischen Regulator-Proteine verantwortlich, welche die Mutterzell- bzw. Vorsporen-spezifischen Gen-Expressionen starten (Stragier und Losick, 1996; Piggot und Losick, 2002). Spo0A~P wirkt aber in späteren Phasen der Sporulation noch aktiv (Fujita und Losick, 2003).

Um nun herauszufinden, ob in *ftsH*-Nullmutante noch phosphoryliertes Spo0A gebildet wird, wurde auf RNA nach Transkripten gesucht, die von Spo0A~P positiv oder negativ reguliert werden. Zu den von Spo0A~P inhibierten Genen gehören *abrB* und *sinR*, wo hingegen die Expression von *spo0E* erst durch aktives Spo0A eingeleitet wird. Daher wurden von diesen Genen und von *ftsH* und *spo0A* als Kontrollen RNA-Sonden angefertigt.

Der Nachweis auf RNA-Ebene erlaubt dabei auch die Detektion sehr geringer Mengen, die auf Protein-Ebene eventuell nicht mehr nachweisbar sind; zudem sind die Sonden im Vergleich zu Protein-Antikörpern relativ schnell und leicht herzustellen sind.

Um Gesamt-RNA isolieren zu können, wurden Wachstumskurven der Stämme in LB-Medium 37°C aufgenommen. Zu den Phasen $t = 0, 1, 2$ und 3 wurden 10 ml Proben entnommen und sofort abgetötet (2.5.1). Danach wurde die Gesamt-RNA isoliert (2.5.2), elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen (2.5.3), mit den jeweiligen Sonden hybridisiert (2.5.6) und detektiert (2.5.7).

A	<i>B. subtilis</i> 1012						
Kontrolle	-1	0	1	2	3	4	
							<i>spo0A</i>
							<i>ftsH</i>
							<i>abrB</i>
							<i>spo0E</i>
							<i>sinR</i>

B





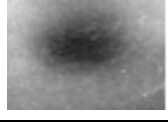
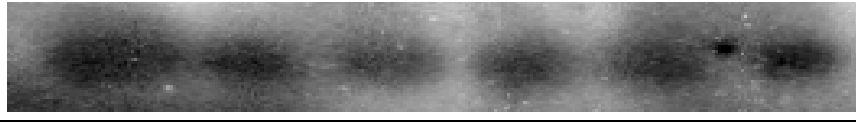
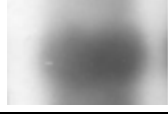

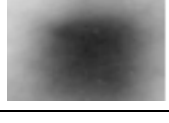

<i>B. subtilis</i> WW01							
Kontrolle	-1	0	1	2	3	4	
							<i>spo0A</i>
							<i>ftsH</i>
							<i>abrB</i>
							<i>spo0E</i>
							<i>sinR</i>

Abb. 22: Detektion spezifischer Transkripte in den beiden *B. subtilis*-Stämmen 1012 (A) und WW01 (B) mit den Sonden *spo0A*, *ftsH*, *abrB*, *spo0E* und *sinR*. Der Nachweis digoxigeninmarkierter Nukleinsäuren erfolgt schließlich in zwei Schritten. Zunächst bindet ein Konjugat aus F_{ab}-Fragment eines hochaffinen Anti-Digoxigenin-Antikörpers und dem Enzym alkalische Phosphatase spezifisch an die digoxigeninmarkierte Sonde. Im zweiten Schritt erfolgt durch Katalyse der alkalischen Phosphatase die Spaltung des Chemolumineszenz-Substrates CDP-Star, wobei eine Lichtemission ausgelöst wird. Diese Lichtemission kann durch Schwärzung eines aufgelegten Röntgenfilms detektiert werden (2.5.7). Diese Prozedur wurde mit den Stämmen für die RNA-Sonden gegen *spo0A*, *ftsH*, *abrB*, *spo0E* und *sinR* durchgeführt.

Wie in Abbildung 20A zu erkennen, ist in *B. subtilis* 1012 die Menge an *spo0A* zum Zeitpunkt T₋₁ am höchsten, um dann bis T₁ abzusinken, ohne völlig zu verschwinden, und danach wieder anzusteigen, wobei das Niveau von T₋₁ aber nicht mehr erreicht wird. *ftsH* hingegen scheint zwar auch in T₁ seine geringste Konzentration zu haben, erreicht seine höchste aber in T₄. *abrB* wiederum verhält sich ähnlich wie *spo0A*, die größte Menge ist bei T₋₁ zu verzeichnen. Danach nimmt sie ab, verschwindet bei T₁ nahezu völlig und steigt dann zu T₂ wieder an, um dann kontinuierlich abzunehmen. Dagegen ist bei *spo0E* von T₋₁ bis T₄ eine kontinuierliche Steigerung zu verzeichnen. *sinR* wird zwar deutlich schwächer


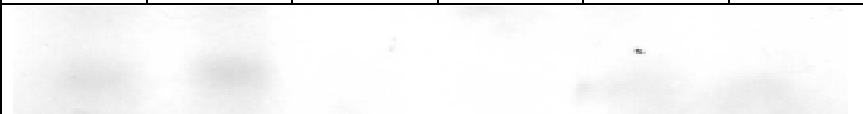
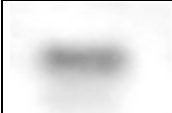







exprimiert, verhält sich aber ansonsten genau wie *spo0A*. Damit verhalten sich alle getesteten Transkripte so, wie man es nach dem Schema aus Abbildung 6 in der Einleitung erwarten würde.

In Abbildung 22B sind die Ergebnisse der selben Tests für *B. subtilis* WW01 zu erkennen. Im Gegensatz zum Wildtyp ist die Menge an *spo0A* zum Zeitpunkt T_{-1} am geringsten und wird in den folgenden Phasen nahezu gleichmäßig exprimiert. Wie zu erwarten zeigt die Kontrolle für *ftsH* natürlich zu keiner Phase Banden. Prinzipiell verhält sich *abrB* ähnlich wie im Wildtyp, die größte Menge ist wieder bei T_{-1} zu erkennen, worauf eine Abnahme bis T_1 folgt, um dann allerdings kontinuierlich anzusteigen. Als Regulator von *abrB* ist zwar nur aktives Spo0A bekannt, es scheint aber noch andere deutlich weniger wirksame Mechanismen zu geben, welche die Expression von *abrB* beeinflussen. Eine Expression von *spo0E* wiederum ist zu keinem Zeitpunkt erkennbar, während sich *sinR* genau antizyklisch zum Wildtyp verhält. Es ist zu T_{-1} noch nicht detektierbar, erreicht sein Maximum bei T_0 , nimmt danach wieder ab und verschwindet bis T_4 fast vollständig. Damit steht fest, dass in WW01 zwar Spo0A gebildet wird, aber alle überprüften Gene, deren Expression durch aktives Spo0A reguliert wird, exprimiert werden, als wäre kein aktives Spo0A vorhanden.

3.2.3 Das mutierte Spo0A aus *B. subtilis* SIK Δ *ftsH* ist in der Lage, die Gene von *abrB*, *spo0E* und *sinR* in der Art zu regulieren, wie das wildtypische phosphorylierte Spo0A in *B. subtilis* 1012

Die vorhergehenden Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Sporulationsprozess in *ftsH*-Nullmutanten abbricht, weil kein aktives Spo0A gebildet wird. Um zu überprüfen, ob dies wirklich der Fall ist und ob FtsH auch noch in späteren Phasen der Sporulation essentiell ist, wurde der Stamm *B. subtilis* SIK Δ *ftsH* konstruiert (1.7.2.2). In diesem Stamm sind *ftsH* und *spo0A* durch Resistenzmarker ersetzt worden, dafür wurde eine *spo0A*-Mutante, deren Protein auch ohne Phosphorylierung aktiv ist, unter der Kontrolle eines IPTG-induzierbaren Promotors in das *amyE*-Gen integriert. Dieser Stamm wurde mit und ohne IPTG im Medium inokuliert, und es wurden zu den gleichen Wachstumsphasen wie bei *B. subtilis* 1012 und WW01 Proben entnommen und, wie bereits beschrieben, Gesamt-RNA isoliert. Diese wurde wiederum aufgetrennt, mittels Northern-Blot auf eine Nylonmembran übertragen und mit den

bereits verwendeten RNA-Sonden hybridisiert und detektiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 23A und B dargestellt.

A		<i>B. subtilis</i> SIK Δ <i>ftsH</i> ohne IPTG						
Kontrolle	-1	0	1	2	3	4		
							<i>spo0A</i>	
							<i>ftsH</i>	
							<i>abrB</i>	
							<i>spo0E</i>	
							<i>sinR</i>	

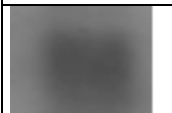

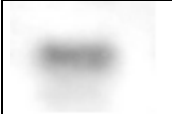
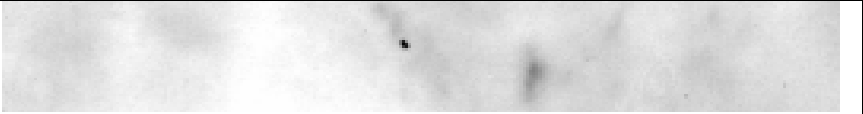


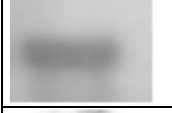


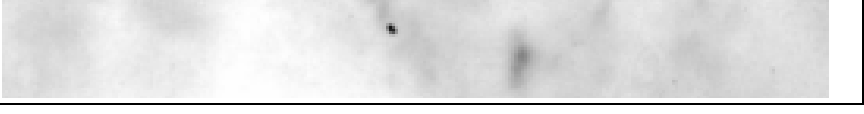
B		<i>B. subtilis</i> SIK Δ <i>ftsH</i> mit IPTG						
Kontrolle	-1	0	1	2	3	4		
							<i>spo0A</i>	
							<i>ftsH</i>	
							<i>abrB</i>	
							<i>spo0E</i>	
							<i>sinR</i>	

Abb. 23: Detektion der RNA von *B. subtilis* SIK Δ *ftsH* ohne IPTG (A) und *B. subtilis* SIK Δ *ftsH* mit IPTG im Medium (B) mit den Sonden *spo0A*, *ftsH*, *abrB*, *spo0E* und *sinR*.

Es wurde das gleich Protokoll wie im vorherigen Versuch verwendet (Abb. 22).

Die Ergebnisse für *B. subtilis* SIK Δ *ftsH* ohne IPTG sind in Abb. 23A dargestellt. Bei *spo0A* dürften eigentlich keine Banden zu detektieren sein, es scheinen aber dennoch sehr schwache Banden vorhanden zu sein, was daran liegen könnte, dass der IPTG-induzierbare Promotor auch ohne IPTG im Medium schwach abgelesen wurde. Dafür war *ftsH* wie erwartet nicht nachzuweisen, ebenso wie *spo0E*, was sich mit den Ergebnissen des Stammes WW01 deckt. Hingegen wird *abrB* über die Phasen T₁ bis T₂ gleichmäßig exprimiert um dann abzunehmen, während *sinR* zum Zeitpunkt T₁ die stärkste Bande aufweist, um danach langsam aber kontinuierlich schwächer zu werden.

Abb. 23B zeigt nun die Ergebnisse für *B. subtilis* SIK Δ *ftsH* mit IPTG. Hier ist *spo0A* nun deutlich und zu allen überprüften Zeitpunkten detektierbar, auch wenn die Bande bei T₁ die stärkste ist und die Banden für T₃ und T₄ deutlich schwächer sind, wie die übrigen. *ftsH* ist wie zu erwarten nicht vorhanden, aber diesmal sind auch *abrB* und *sinR* zu keinem Zeitpunkt detektierbar, was sich aber daraus erklärt, dass beide von Spo0A inhibiert werden und dessen Überproduktion scheint deren Expression unter das detektierbare Niveau zu senken. Dagegen verhält sich *spo0E* wie *spo0A*, die stärkste Bande findet sich ebenfalls bei T₁ und die Banden für T₃ und T₄ sind ebenfalls nur noch ungefähr halb so stark, wie die übrigen. Das mutierte Spo0A ist also in der Lage, die Expression der überprüften Gene in der Art zu regulieren, wie das wildtypische phosphorylierte Spo0A. Dieser Versuch kann aber nicht zeigen, ob es auch den Sporulationsdefekt kompensieren kann.

3.2.4 Die Mutante *B. subtilis* SIK Δ *ftsH* ist in der Lage, den Sporulationsdefekt einer *ftsH*-Nullmutante zu kompensieren

Um zu klären, ob das mutierte Spo0A aus *B. subtilis* SIK Δ *ftsH* in der Lage ist, den Sporulationsdefekt einer *ftsH*-Nullmutante zu kompensieren, wurde der Stamm einem Sporulationstest unterzogen (1.4.2). Es wurden Kulturen des Stammes in Sporulations-Medium (DS) mit und ohne IPTG angelegt und bei 37°C inkubiert. 36 Stunden nach Erreichen der stationären Phase wurden Proben genommen und die lebenden Zellen abgetötet. Die Proben wurden ausplattiert und am nächsten Tag ausgezählt. Der Stamm *B. subtilis* AS10 diente als Negativkontrolle und zeigte nach Behandlung mit Lysozym, Hitze oder Chloroform

weniger als 0,1% Kolonien im Vergleich zu *B. subtilis* 1012, der als Positivkontrolle eingesetzt wurde.

Tab. 8: Die Fähigkeit von *B. subtilis* SIK Δ *ftsH* in Ab- und Anwesenheit von IPTG Sporen zu bilden

Behandlung mit	SIK Δ <i>ftsH</i> ohne IPTG	SIK Δ <i>ftsH</i> mit IPTG
Lysozym	6%	78%
Hitze	8%	83%
Chloroform	9%	81%

Es wurden Übernachtskulturen des Stammes in Sporulations-Medium (DS) angelegt, aus denen am nächsten Morgen je 50 ml DS-Medium mit und ohne 1 mM IPTG auf eine OD₅₇₈ von 0,05 inokuliert und bei 37°C inkubiert wurden. 36 Stunden nach Erreichen der stationären Phase wurden Proben genommen und unbehandelt oder nach Behandlung mit Lysozym, Hitze oder Chloroform in verschiedenen Verdünnungsstufen auf LB-Platten ausgestrichen. Die unbehandelten Proben wurden zur Ermittlung der Lebendzellzahl verwendet, welche zum Abgleich der Stämme untereinander notwendig war. Die Zahl der von *B. subtilis* 1012 nach der Behandlung mit Chloroform gebildeten Kolonien war die größte und wurde auf 100% gesetzt.

Aus der Tabelle geht klar hervor, dass der Stamm *B. subtilis* SIK Δ *ftsH* unter Zugabe von IPTG in der Lage ist zu sporulieren. Im Vergleich zum Wildtyp und den Sporulationsfrequenzen aus Tabelle 7 fällt die Sporulationsrate allerdings um 15-20% niedriger aus. Wenn man also die notwendige Phosphorylierung von Spo0A umgeht, indem man eine Spo0A-Mutante einsetzt, die auch ohne phosphoryliert zu werden aktiv ist, kann die Sporulationsfähigkeit in *ftsH*-Nullmutanten wiederhergestellt werden, wenn auch nicht mit gleicher Effizienz.

Auf den ersten Blick ist es verwunderlich, dass der Stamm auch ohne IPTG Zugabe in geringem Maße Sporen bildet. Dieses Phänomen lässt sich aber damit erklären, dass der IPTG-induzierbare Promotor auch ohne IPTG im Medium schwach abgelesen wird. Dies korreliert auch mit der Beobachtung aus Tabelle 23A, in der bei *spo0A* im Stamm *B. subtilis* SIK Δ *ftsH* ohne IPTG eigentlich keine Banden zu detektieren sein dürften, aber dennoch sehr schwache Banden vorhanden zu sein scheinen.

4 Diskussion

In *E. coli* wurde die Metalloprotease FtsH bereits eingehend untersucht und die Bedeutung verschiedener Domänen und Sequenzmotive aufgrund von Mutationen im *ftsH*-Gen definiert (Schumann, 1999). So wurden z.B. Punktmutationen in die ATPase-, die Zinkbindungs- und die periplasmatische Domäne eingeführt, und die Mutanten dann charakterisiert. Unter anderem wurde im konservierten Bereich der Walker-A-Box des *E. coli* FtsH ein Lysinrest gegen einen Asparaginrest ausgetauscht, was zum Verlust der ATPase-Aktivität führte (Akiyama *et al.*, 1996a und 1998b). Die Bedeutung der Protease- und ATPase-Aktivität von FtsH wurde auch für die Hefehomologe Yat10p, Yat12p und Yme1 beschrieben, so wurden z.B. in den FtsH-Homologen aus Hefe YTA10 und YTA12 im konservierten Zinkbindungsmotiv der Glutamatrest durch einen Glutaminrest ersetzt, wodurch die Proteaseaktivität verloren ging (Arlt *et al.*, 1996; Leonhard *et al.*, 1999). Diese Untersuchungen führten u.a. zu der Hypothese, dass FtsH neben der Protease- auch Chaperon-Aktivität besitzt. So ist die gereinigte AAA-Domäne des Hefe-Homologs Yme1 in der Lage, entfaltete Polypeptide zu binden und dadurch ihre Aggregation zu verhindern (Leonhard *et al.*, 1999), und das *E. coli* FtsH-Protein kann zwar denaturierte alkalische Phosphatase binden, allerdings nicht ihre Rückfaltung in die native Form veranlassen; das native Enzym wird nicht gebunden (Akiyama *et al.*, 1998a).

Natürlich ist auch möglich, dass FtsH nie als Chaperon fungiert, oder nur nach Hemmung seiner Protease-Aktivität durch λ CIII und SpoVM.

Die meisten ATP-abhängigen Proteasen bestehen aus zwei getrennten Untereinheiten, wie z.B. ClpXP (Goldberg, 1992; Gottesmann *et al.*, 1993), für das auch eine Chaperon-Aktivität nachgewiesen ist (Carolyn *et al.*, 1997). Für Lon hingegen ist eine Chaperon-Funktion nur für das mitochondriale Lon nachgewiesen, in Bakterien ist dies noch nicht gelungen (Carolyn *et al.*, 1997).

Über das FtsH-Protein von *B. subtilis* liegen bislang nur genetische Daten vor. Eine Nullmutante zeigt einen pleiotropen Phänotyp, der darauf schließen lässt, dass FtsH bei mehreren zellulären Vorgängen eine wichtige Rolle spielt (Deuerling *et al.*, 1997; Lysenko *et al.*, 1997). In Abwesenheit von FtsH-Protein wachsen die Zellen filamentös, sind extrem sensitiv gegenüber Hitze- und hyperosmotischem Stress, bilden praktisch keine natürliche Kompetenz aus und sind Sporulations-negativ. Das filamentöse Wachstum beruht auf einer

gesteigerten Produktion des Penicillin-Bindeproteins Pbp4*. Eine *ftsH pbpE* (codiert für Pbp4*) Doppelmutante zeigt wieder normales Wachstum (Zellmeier *et al.*, 2003). Weiterhin konnte unter Verwendung von FtsH-GFP gezeigt werden, dass sich das markierte FtsH während der vegetativen Zellteilung im Septum und während der frühen Phase der Sporulation (Phase 0) zunächst in den polaren Septen und später in der Hülle der Vorspore akkumuliert (Wehrl *et al.*, 2000). Die Funktion von FtsH in beiden Fällen ist bislang ungeklärt.

Während der Sporulation beeinflusst FtsH die Aktivität des Master-Regulators der Phase 0, Spo0A. Dieses Protein wird nach Eintritt in der Sporulation zunächst in geringen Mengen synthetisiert, dann über ein Phosphorelay phosphoryliert und damit in seine aktive Form überführt. Phosphoryliertes Spo0A (Spo0A~P) bindet an die DNA, an sog. Spo0A-Boxen und fungiert dabei entweder als Transkriptions-Repressor oder –Aktivator (Predich *et al.*, 1992; Strauch *et al.*, 1993; Fujita und Sedaie, 1998). Die erste Spo0A-Box, an die Spo0A~P bindet, liegt im Bereich des Promotors des Gens *abrB* und führt zu der Inhibition der Transkription von *abrB* (Grossman 1995). Bei dem AbrB-Protein handelt es sich um einen Transkriptions-Repressor, der die Transkription verschiedener Gene inhibiert. Dazu gehören z.B. *spo0H* und *spo0E* (Grossman. 1995). Zusätzlich spielt *ftsH* noch in einem späten Stadium der Sporulation (Phase V) eine Rolle. Nach den bislang publizierten Daten muss in dieser Phase die Protease-Aktivität inhibiert werden. Dies geschieht vermutlich durch das 26-Aminosäure-Peptid SpoVM. Es konnte gezeigt werden, dass SpoVM die Protease-Aktivität von *E. coli* FtsH zunächst hemmt, dann aber selbst von FtsH degradiert wird (Cutting *et al.*, 1997). Daher kann davon ausgegangen werden, dass SpoVM auch die proteolytische Aktivität des *B. subtilis*-Proteins hemmt, was aber noch nachzuweisen ist. Somit könnte SpoVM eine Funktion erfüllen, die bereits für das Phagen λ CIII-Protein beschrieben wurde (Cutting *et al.*, 1997).

Ein wesentliches Ziel dieser Dissertation bestand darin zu untersuchen, welche der beiden funktionellen Domänen von FtsH für die verschiedenen Phänotypen verantwortlich sind. Dabei wurde auf bereits konstruierte Punkt-Mutanten zurückgegriffen, die von Frau E. Harfst im Rahmen ihrer Diplomarbeit konstruiert worden waren (1999; Kotschwar *et al.*, 2004).

4.1 Auswirkung der Punktmutation im Bereich der ATPase-Domäne

Um die mutierten FtsH-Proteine *in vivo* untersuchen zu können, wurden alle fünf Allele (das Wildtyp-Allel als Kontrolle) in den Vektor pGEX-2T einkloniert (Tab. 6). Dies erlaubte die Überproduktion und anschließende Reinigung aller Proteine mittels Affinitäts-Chromatographie unter Ausnutzung des N-terminal lokalisierten GST-Tags. Außerdem bewirkt dieser Tag die Löslichkeit dieser integralen Membran-Proteine in Abwesenheit von Detergenz (Teff *et al.*, 2000). Alle Proteine wurden auf ihre ATPase-Aktivität getestet. Während das Wildtyp-Protein die höchste Aktivität zeigte, war die von FtsH03 und FtsH04 um etwa 20% reduziert, während FtsH02 und FtsH05 keinerlei Aktivität zeigten (Abb. 19). Aus diesen Daten kann geschlossen werden, dass der Austausch der Aminosäure Lysin gegen Asparagin in der Walker-A-Box die ATPase-Aktivität vollständig eliminiert. Bei dieser Box handelt es sich um ein sog. P-Loop-Motiv (GXXXXGKT/S), das für die Bindung der Phosphatgruppe von ATP essentiell ist (Möller und Amons, 1985). Daher sollte der vorgenommene Austausch zum Verlust der Nukleotid-Bindung führen, wie es bereits bei dem *E. coli*-Enzym (Akiyama *et al.*, 1996a) und dem Hefe-Homolog (Arlt *et al.*, 1996; Leonhard *et al.*, 1999) beschrieben worden war. Diese Ergebnisse zeigen, dass der Effekt dieses Aminosäureaustausches auf das *B. subtilis*-Protein übertragbar ist und belegt die Essentialität der Aminosäure Lysin an dieser Position. Die Reduktion der ATPase-Aktivität der restlichen Mutanten-Proteine, bei denen die ATPase-Domäne nicht betroffen war, kann dadurch erklärt werden, dass ein Aminosäureaustausch im Bereich der Zink-Bindungsdomäne Auswirkungen auf die korrekte Faltung haben kann.

4.2 Auswirkung der Punktmutation im Bereich der Zink-Bindungsdomäne

Die Auswirkung der beiden Aminosäureaustausche im Bereich der Zink-Bindungsdomäne wurde im Protease-Test analysiert. Da bislang kein natürliches Substrat von *B. subtilis* FtsH bekannt ist, wurde β -Casein verwendet, von dem publiziert worden war, dass es von FtsH als Substrat erkannt wird (Shotland *et al.*, 1997). In diesem Test wurden wiederum alle fünf GST-FtsH-Proteine untersucht. Die Messungen ergaben, dass nur das Wildtyp-FtsH in Anwesenheit von ATP in der Lage war, β -Casein abzubauen. Alle vier Mutanten-Proteine erwiesen sich als inaktiv. Aus diesen Ergebnissen ist zu schließen, dass erstens beide

Austausche zum Verlust der Protease-Aktivität führen und zweitens, dass FtsH in Abwesenheit einer aktiven ATPase-Domäne nicht in der Lage ist, das Substrat abzubauen. Beide Austausche, die von Glutamat im HEXXH-Motiv gegen Glutamin oder Alanin führten auch bei den Hefe-Homologen zum Verlust der Protease-Aktivität (Arlt *et al.*, 1996; Leonhard *et al.*, 1999). Allerdings ist FtsH auch nach dem Verlust seiner Protease-Aktivität noch in der Lage, Substrate zu binden, Komplexe mit ihnen zu bilden und diese so zu stabilisieren (Makyio *et al.*, 2002).

Die fehlende Protease-Aktivität von FtsH02 war nicht überraschend. *In-vitro*-Experimente mit *E. coli* FtsH haben gezeigt, dass alle bekannten Substrate mit Ausnahme von λ CIII ATP-abhängig abgebaut werden (Akiyama *et al.*, 1996b; Herman *et al.*, 1997; Tomoyasu *et al.*, 1995 und 1998). Im Vergleich mit anderen ATP-abhängigen Proteasen wie z.B. den Clp-Proteasen, könnte die ATP-Hydrolyse mit der Entfaltung der Substrate gekoppelt sein, um diese dann der proteolytischen Aktivität von FtsH zugänglich zu machen (Akiyama *et al.*, 1996a und 1998b; Shotland *et al.*, 1997). Bei Inaktivierung der ATPase-Aktivität werden dann die Substrate nicht mehr entfaltet und dadurch für den Abbau von FtsH unzugänglich. Neuere Untersuchungen weisen jedoch darauf hin, dass FtsH nur eine schwache intrinsische Entfaltungs-Aktivität besitzt; daher ist die ATP-Hydrolyse primär für die Translokation der Substratproteine zur proteolytischen Domäne notwendig (Herman *et al.*, 2003).

Eine Ausnahme bildet das λ CIII-Protein, das *in vivo* auch nach Inaktivierung der ATPase-Aktivität von FtsH degradiert wird. Mit einer molaren Masse von 6 kDa handelt es sich um ein relativ kleines Protein, dass dem Abbau durch FtsH direkt zugänglich ist und nicht erst entfaltet und transloziert werden muss. Dies führt zu einer ATPase-unabhängigen Degradation (Herman *et al.*, 1997). Dies sollte auch für SpoVM gelten. Außerdem konnte gezeigt werden, dass in *E. coli* ATP die Komplexbildung von FtsH mit seinen beiden Membran-gebundenen Modulatoren HflK und HflC stimuliert (Kihara *et al.*, 1996). Allerdings sind diese beiden Modulatoren bei *B. subtilis* nicht vorhanden. Andererseits könnte sich der Verlust der ATPase-Aktivität daher auch auf die Oligomerisierung von FtsH auswirken und damit seine Funktion beeinträchtigen. In Hefe konnte für die Homologe Yta10p und Yta12p gezeigt werden, dass ihre Komplexbildung ATP-abhängig ist, und sie nur in komplexierter Form aktiv sind (Arlt *et al.*, 1996). Außerdem ist ATP für die proteolytische Aktivität erforderlich (Pajic *et al.*, 1994; Arlt *et al.*, 1996).

4.3 Die *ftsH*-Allele mit den Punktmutationen verhalten sich wie die Knockout-Mutanten

Es waren zwei Klassen von *B. subtilis*-Stämmen konstruiert worden, solche mit dem Wildtyp-Allel an homologer Stelle und dem mutierten Allel an ektopischer (im *amyE*-Locus) und solche mit einer Deletion des Wildtyp-Allels und dem Mutanten-Allel in *amyE*. Diese beiden Klassen von Stämmen wurden konstruiert, um eine mögliche Beeinflussung von Wildtyp- und Mutanten-Allel zu untersuchen. In diesen Stämmen könnte es zur Ausbildung von Hetero-Oligomeren kommen. Im Falle von FtsH-GFP wurde gefunden, dass in Zellen, die nur FtsH-GFP exprimieren, keine Fluoreszenz zu beobachten war (Wehrl *et al.*, 2000). Nur Zellen, die sowohl Wildtyp-FtsH als auch das Hybrid-Protein synthetisierten, zeigten Fluoreszenz. Dieses Ergebnis wurde dahingehend interpretiert, dass FtsH-GFP allein keine Oligomere ausbilden kann. Nur in Anwesenheit von zusätzlich Wildtyp-FtsH bilden sich fluoreszierende Oligomere. Wenn diese Annahme stimmt, dann sollten nicht alle FtsH-Moleküle im Hexamer dem Wildtyp entsprechen. Falls allerdings entweder eine intakte ATPase- oder/und Zink-Bindungsdomäne eine Voraussetzung für Oligomerisierung darstellen, dann bilden sich keine gemischten Oligomere. Beim FtsH-GFP lagen beide Domänen in Wildtypform vor, das Polypeptid enthielt am C-Terminus zusätzlich den GFP-Anteil.

Western-Blot-Analysen zeigten, dass alle Zellen, die nur das mutierte *ftsH*-Allel enthielten, dies nach Zugabe von Xylose als Induktor exprimierten. Diese Analyse bestätigte zum einen die Korrektheit der konstruierten Stämme und zum anderen, dass die mutierten FtsH-Proteine nur nach Zugabe des Induktors synthetisiert wurden.

Als erstes wurde die Morphologie der Stämme überprüft, die nur mutiertes FtsH synthetisieren. Es zeigte sich, dass in Anwesenheit von Xylose alle Zellen filamentöses Wachstum zeigten (Tab. 8 und Abb. 7). Wurden hingegen die Stämme getestet, die Wildtyp und mutiertes Protein synthetisierten, dann wurde stäbchenförmiges Wachstum beobachtet. Daraus kann geschlossen werden, dass entweder keine gemischten Oligomere gebildet werden wie bereits diskutiert, oder dass gemischte Oligomere nicht zu einer verstärkten Transkription von *pbpE* führen. Ein gleiches Bild ergab sich bei der Bestimmung der Sporulationsfrequenzen. Sowohl die ATPase- als auch die Zinkbindungs-Domäne sind für die Ausbildung von Sporen notwendig.

4.4 Die *ftsH*-Allele können den *ftsH*-Nullmutanten Phänotyp nach Hitze- oder osmotischem Schock nicht supprimieren

Die Wachstumskurve der *ftsH*-Mutanten in LB-Medium bei 37°C ist vergleichbar mit dem des Wildtyps (Abb. 10 und 11). Dies ist in Übereinstimmung mit der Beobachtung für die *ftsH*-Nullmutante. Wurden die Zellen einem Hitze- oder osmotischem Schock ausgesetzt, dann stellt die *ftsH*-Nullmutante ihr Wachstum ein (Deuerling *et al.*, 1997). Ein vergleichbares Verhalten wurde für die Stämme KMΔ01-Δ05 beobachtet (Abb. 13 und 15). Daraus kann gefolgert werden, dass zur Suppression von Hitze- und osmotischem Schock sowohl die ATPase- als auch die Protease-Aktivität benötigt werden. Daraus kann auch geschlossen werden, dass FtsH unter diesen Bedingungen gebraucht wird, um denaturierte Proteine abzubauen, wofür eben beide Aktivitäten notwendig sind. Eine Chaperon-Funktion kann in diesen Fällen ausgeschlossen werden, da dann die ATPase-Aktivität ausreichen würde, um seine Funktion zu erfüllen (Carolyn *et al.*, 1997). Wenn das der Fall wäre, hätten die Mutationen in den Stämmen KMΔ03 und Δ04 (nur Zinkbindungsmotiv) den pleiotropen Phänotyp komplementieren oder zumindest abmildern können, was aber nicht der Fall ist.

Die Stämme KM01-05 zeigten insbesondere nach einem Hitzeschock, bei zusätzlicher Expression des mutierten *ftsH*-Allels, eine schnellere Erholung gegenüber solchen Zellen, die in Abwesenheit von Xylose gewachsen waren (Abb. 12A und B). Bei einem osmotischem Schock ist dies weniger deutlich ausgeprägt, aber noch erkennbar (Abb. 14A und B). Eine mögliche Erklärung dafür könnte die erhöhte Menge an FtsH in der Zelle bereits vor dem Schock sein. Da von Beginn an Xylose im Medium vorhanden war, wurden die mutierten *ftsH*-Allele kontinuierlich exprimiert. Somit war die Menge an FtsH in der Zelle gegenüber dem Wildtyp bereits vor dem Schock erhöht. Daraus lässt sich aber auch schließen, dass die mutierten FtsH mit dem Wildtyp-FtsH funktionsfähige Komplexe bilden können. Denn an Hand der Stämme KMΔ01-Δ05 kann gefolgert werden, dass aus den mutierten FtsH-Proteinen alleine keine oder zumindest keine funktionsfähigen Oligomere entstehen. Würden sich aber keine gemischten Komplexe bilden, dürfte die, durch die mutierten FtsH-Proteine hervorgerufene, erhöhte FtsH-Konzentration in der Zelle keine Auswirkungen haben. Die Stämme KM01-05 müssten sich dann wie der Wildtyp verhalten oder negativ beeinflusst werden, da kontinuierlich defekte Proteine gebildet würden, die wieder abgebaut werden müssten.

4.5 Die *ftsH*-Mutanten verhalten sich auch bei der Synthese von Subtilisin wie eine *ftsH*-Knockout

Beim Übergang in die stationäre Phase beginnt *B. subtilis* mit der Sekretion von ca. 20 Exoproteinen, darunter die Protease Subtilisin (Hecker, 2003). In einer *ftsH*-Nullmutante ist die Sekretion von Subtilisin stark reduziert, und dies beruht auf einer verminderten Synthese der Protease. Der Grund dafür ist, dass, wie bereits erwähnt, das Subtilisin-Gen unter der negativen Kontrolle von AbrB steht. Dessen Expression wird durch Spo0A~P seinerseits negativ reguliert, was dann zu einer Induktion des Subtilisin-Gens führt (Deuerling *et al.*, 1997).

Auch im Fall der Subtilisin-Synthese werden die bisherigen Ergebnisse bestätigt. In den Stämmen KM01-05 wurde eine Subtilisin-Aktivität gemessen, die der in der Wildtyp-Kontrolle entsprach. Im Gegensatz dazu weisen die Stämme KMΔ01-Δ05 eine signifikant reduzierte Subtilisin-Aktivität auf, die der entspricht, die mit der *ftsH*-Nullmutante gemessen wurde. Fasst man die bisherigen Experimente zusammen, dann lässt sich schlussfolgern, dass FtsH sowohl seine ATPase- als auch seine Protease-Aktivität benötigt, um funktionsfähig zu sein.

4.6 Spo0A wird in einer *ftsH*-Nullmutante gebildet

Wie bereits erwähnt, ist Spo0A der Master-Regulator für den Eintritt in das Sporulations-Programm. Nur wenn am Ende der Phase 0 eine bestimmte Menge an Spo0A~P vorliegt, dann ist der „point of no return“ erreicht, und die Zellen durchlaufen das gesamte genetisch-regulierte Sporulations-Programm (Hoch, 1993). Spo0A gehört zur Familie der Response-Regulator Transkriptionsfaktoren (Hoch, 2000). Die Phosphorylierung von Spo0A erfolgt durch ein Phosphorelay, bestehend aus mehreren Kinasen und den Phosphorelay-Proteinen Spo0F und Spo0B. Umgebungs- und intrazelluläre Signale modulieren dieses Relay und bestimmen dadurch den Phosphorylierungsgrad von Spo0A (Grossman, 1995). Sind die ersten Spo0A-Moleküle phosphoryliert, dann stimuliert Spo0A~P seine eigene Synthese, was zu einer verstärkten Produktion von zunächst Spo0A und dann Spo0A~P führt (Fujita und Sadaie, 1998). Phosphoryliertes Spo0A bewirkt in Verbindung mit dem Housekeeping-

Sigmafaktor σ^A und dem alternativen Sigmafaktor σ^H die Induktion der Transkription zu Beginn der Sporulation (Stragier und Losick, 1996; Piggot und Losick, 2002). Da Spo0A auch jenseits der Phase O noch nachzuweisen ist, wird vermutet, dass dieses Protein auch im weiteren Verlauf der Sporulation noch benötigt wird (Fujita und Losick, 2003).

Aufgrund der bislang vorliegenden Ergebnisse wurde gefolgert, dass FtsH entweder an der Synthese oder an der Phosphorylierung oder an beidem von Spo0A beteiligt ist (Deuerling *et al.*, 1997). Um zwischen diesen Alternativen zu unterscheiden, wurden Immunoblot-Experimente mit Extrakten aus dem *B. subtilis* Wildtyp- und dem $\Delta ftsH$ -Stamm miteinander verglichen (Abb. 19A und B). Es wurde gefunden, dass auch in dem Knockout-Stamm WW01 Spo0A ab T₀ in einer Menge vorhanden ist, die der im Wildtyp entspricht. Somit ist *ftsH* nicht an der Synthese von Spo0A beteiligt, und es war daher zu vermuten, dass *ftsH* die Phosphorylierung beeinflusst.

4.7 *ftsH* ist in die Phosphorylierung von Spo0A involviert

Nachdem mit einem Western-Blot nachgewiesen worden war, dass Spo0A auch in einer *ftsH*-Nullmutante synthetisiert wird, sollte in einem zweiten Schritt gezeigt werden, dass dieses Spo0A-Protein nicht phosphoryliert wird. Eine Möglichkeit dieses Nachweises besteht im direkten Nachweis des phosphorylierten Spo0A. Eine weitere Möglichkeit besteht in seinem indirekten Nachweis mit genetischen Methoden. Wie bereits erwähnt fungiert Spo0A~P als Transkriptions-Aktivator und –Repressor. Dies eröffnet die Möglichkeit, durch Messung der Menge an Transkripte in einem Northern-Blot die Expression Spo0A-regulierter Gene zu untersuchen. Es wurden zwei Gruppen von Genen ausgewählt, solche, die unter positiver und solche, die unter negativer Kontrolle von Spo0A~P stehen. Unter negativer Kontrolle steht *abrB*, das seinerseits *spo0E* negativ reguliert (Grossman, 1995). Falls Spo0A phosphoryliert wird, sollte daher die Menge an *abrB*-Transkript ab- und die an *spo0E* zunehmen. Als weiteres Gen wurde *sinR* ausgewählt. Dieses Gen steht unter der negativen Kontrolle von *sinI*. Phosphoryliertes Spo0A aktiviert die Expression von *sinI*, welches seinerseits die Transkription von *sinR* inhibiert (Grossman, 1995).

Die Detektion der Northern-Blots mit Gesamt-RNA aus *B. subtilis*-Wildtyp und dem *ftsH*-Nullmutanten-Stamm WW01 mit Antisense-Sonden zu den genannten Genen lassen sich nur dadurch erklären, dass Spo0A in Abwesenheit von FtsH nicht phosphoryliert wird. Während die Ergebnisse mit dem Wildtyp-Stamm der Erwartung entsprechen, sind die der Nullmutante nur durch inaktives Spo0A zu erklären. Während die *spo0E*-Transkripte nicht nachzuweisen sind, sind die für *abrB* und *sinR* deutlich zu erkennen (Fig. 20A und B). Daraus ist zu schließen, dass intaktes *ftsH* für die Phosphorylierung benötigt wird. Der Sporulationsprozess stoppt also in *ftsH*-Nullmutanten aufgrund fehlender oder unzureichender Phosphorylierung von Spo0A.

4.8 Das *spo0A*-Allel *sad67* supprimiert den Phosphorylierungsdefekt von Spo0A in *ftsH*-Nullmutanten

Da nun davon auszugehen war, dass Spo0A im Stamm WW01 nicht phosphoryliert und dadurch der Sporulationsprozess unterbrochen wird, wurde nach einer Möglichkeit gesucht, diesen Defekt zu supprimieren. Eine solche Möglichkeit besteht in der Verwendung von einem *spo0A*-Allel, welches sich durch eine kleine Deletion innerhalb seiner kodierenden Sequenz in auch unphosphoryliert in seiner aktiven Form befindet. Die Gruppe von A. Grossman hatte solche Allele isoliert, und eines dieser Allele trägt die Bezeichnung *sad67* (Ireton *et al.*, 1993).

Es wurde ein Stamm konstruiert, bei dem das *spo0A*-Gen an homologer Stelle inaktiviert und das *spo0Asad67*-Allel unter IPTG-Kontrolle ektopisch im *amyE*-Locus integriert ist. In diesen Stamm wurde dann eine *ftsH*-Nullmutante eingekreuzt. Dieser Stamm wurde SIK Δ *ftsH* genannt. Ist dieser Stamm nach Zugabe von IPTG in der Lage, aktives Spo0A zu produzieren? Die in Abb. 21A und B gezeigten Northern-Blots zeigen, dass in der Tat die Transkripte von *abrB* und *sinR* nicht mehr zu detektieren sind, während das für *spo0E* nachweisbar ist. Wurde der Stamm SIK Δ *ftsH* hingegen in Abwesenheit von IPTG inkubiert, dann wurde ein gegensätzliches Ergebnis detektiert. Dies ist dann dadurch zu erklären, dass aktives Spo0A fehlt. Die schwachen Banden für *spo0A*-Transkript sind dadurch zu erklären, dass der IPTG-regulierbare Promotor leaky ist. Warum wird in einer *ftsH*-Nullmutante kein aktives Spo0A synthetisiert? Zwei Möglichkeiten sind zu diskutieren: die Phosphorylierung

von Spo0A unterbleibt vollständig oder entstehendes Spo0A~P wird sofort wieder dephosphoryliert. In beiden Fällen kann dies bedeuten, dass FtsH einen negativen Regulator der Phosphorylierung degradieren muss. Bei diesem hypothetischen Regulator könnte es sich um einen bereits bekannten oder bislang unbekannten Regulator handeln. Die bisher bekannten sind die Phosphatasen RapA, eventuell RapB und Spo0E (Grossman, 1995).

Nachdem gezeigt worden war, dass im Stamm SIK $\Delta ftsH$ nach Zugabe von IPTG aktives Spo0A gebildet wird, wurde untersucht, ob Zellen dieses Stammes in der Lage sind, Sporen zu bilden. Es war publiziert worden, dass FtsH auch während der Phase IV eine wichtige Rolle spielt und für den Abbau von BofA oder/und SpoIVFA verantwortlich ist (Resnekov, 1999). Allerdings war kürzlich publiziert worden, dass die Protease SpoIVB den Abbau von SpoIVFA katalysiert (Dong und Cutting, 2003). Daher wurde die Sporulationsfrequenz dieses Stammes bestimmt. Da dieser Stamm Sporen ausbilden kann, wenn auch mit reduzierter Frequenz verglichen mit dem Wildtyp-Stamm, wird *ftsH* nur in der Phase 0 benötigt. Die geringe Sporulationsfrequenz von SIK $\Delta ftsH$ in Abwesenheit von IPTG kann durch die Leakyness des Promotors erklärt werden.

4.9 Ausblick

Die FtsH-Protease ist an einer Vielzahl von zellulären Prozessen beteiligt. Die genaue Funktion innerhalb dieser Vorgänge konnte auch im Verlauf dieser Arbeit nicht geklärt werden. Es konnte nur gezeigt werden, dass sowohl die ATPase- als auch die Protease-Aktivität für alle diese Prozesse benötigt wird. Um weitere Informationen über die Funktion von FtsH in diesen Prozessen zu erhalten, muss zunächst die Identifizierung von Substraten und Interaktionspartnern erfolgen. Hier bieten sich mehrere experimentelle Möglichkeiten an: Ko-Immunopräzipitation, Vergleich von DNA-Macroarrays und der Proteome von Wildtyp- und Knockout-Mutante unter den entsprechenden Bedingungen, wie dies bereits im Falle von Wachstum in LB-Medium bei 37°C zur Identifizierung von Pbp4* geführt hat (Zellmeier *et al.*, 2003).

Im Falle der fehlenden Aktivierung von Spo0A kann der postulierte negative Regulator mittels Transposon-Mutagenese ermittelt werden ausgehend von dem Stamm WW01. Hat das

Transposon den negativen Regulator ausgeschaltet, dann sollte die Mutante Sporen ausbilden können. Solche Mutanten sollten unter entsprechenden Bedingungen selektierbar sein. Probleme würde es geben, wenn FtsH mindestens zwei verschiedene negative Regulatoren abbauen müsste.

Weiterhin bietet sich noch an, die Funktion von FtsH im Zusammenhang mit SpoVM zu untersuchen. Da angenommen wird, dass SpoVM FtsH während der Phase V inhibiert und auch ein Substrat für FtsH darstellt (Cutting *et al.*, 1997; Prajapati *et al.*, 2000), sollte zunächst ein Proteasetest durchgeführt werden, um diese Vermutung zu klären. Dann sollte eine *spoVM*-Nullmutante konstruiert und analysiert werden, um zu klären, warum FtsH durch SpoVM inhibiert werden muss. Zwei Hypothesen bieten sich an. (1) SpoVM inhibiert die Protease-Aktivität durch Protein-Protein Interaktion, lässt aber die Chaperon-Aktivität intakt. Diese wird dann während der späten Phase der Sporulation benötigt. (2) Falls SpoVM die Protease-Aktivität nicht hemmt, degradiert FtsH mindestens ein Protein, welches in der späten Phase der Sporulation essentiell ist. Die Beobachtung, dass das *E. coli* FtsH-Protein nur eine schwache intrinsische Entfaltungsaktivität zeigt (Herman *et al.*, 2002), spricht gegen die erste Hypothese. Wie kann man die zweite beweisen? Eine experimentelle Möglichkeit besteht darin, dass man das Proteom einer Wirtszelle mit der einer *spoVM*-Nullmutante aus der Phase V miteinander vergleicht. Falls die zweite Hypothese zutrifft, sollte im *spoVM*-Nullmutante Proteom mindestens ein Proteinspot fehlen oder signifikant verringert sein.

5 Literatur

Addinall S.G., Lutgenhaus J. (1996)

FtsA is localized to the septum in a FtsZ dependent manner.

J. Bacteriol. **178**: 7167-7172

Anilkumar G., Srinivasan R., Anand S.P., Ajitkumar P. (2001)

Bacterial cell division protein FtsZ is a specific substrate for the AAA family protease FtsH.

Microbiology **147**: 516-517

Akiyama Y., Ogura T., Ito K. (1994a)

Involvement of FtsH in protein assembly into and through the membrane. I. Mutations that reduce retention efficiency of cytoplasmic reporter.

J. Biol. Chem. **269**: 5218-5224

Akiyama Y., Shirai Y., Ito K. (1994b)

Involvement of FtsH in protein assembly into and through the membrane. II. Dominant mutations affecting FtsH function.

J. Biol. Chem. **269**: 5225-5229

Akiyama Y., Yoshihisa T., Ito K. (1995)

FtsH, a membrane-bound ATPase, forms a complex in the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*.

J. Biol. Chem. **270**: 23485-23490

Akaiyama Y., Kihara A., Tukuda H., Ito K. (1996a)

FtsH (HflB) is an ATP-dependent protease selectively acting on SecY and some other membrane proteins.

J. Biol. Chem. **271**: 31196-31201

Akaiyama Y., Kihara A., Ito K. (1996b)

Subunit of an ATPase F₀ sector is a substrate of the FtsH protease in *Escherichia coli*.

FEBS Letters **399**: 26-28

Akaiyama Y., Ehrmann M., Kihara A., Ito K. (1998a)

Polypeptide binding of *Escherichia coli* FtsH (HflB).

Mol. Microbiol. **28**: 803-812

Akaiyama Y., Kihara A., Mori H., Ogura T., Ito K. (1998b)

Roles of periplasmic domain of *Escherichia coli* FtsH (HflB) in protein interactions and activity modulation.

J. Biol. Chem. **273**: 22326-22333

Angostopoulos C., Spizizen J. (1961)

Requirements for transformation in *Bacillus subtilis*.

J. Bacteriol. **81**: 741-746

- Arlt H., Tauer R., Feldmann H., Neupert W., Langer T. (1996)**
The Yta10-12 complex, an AAA protease with chaperone-like activity in the inner membrane of mitochondria.
Cell **85**: 875-885
- Asai K., Kawamura F., Yoshikawa H., Takahashi H. (1995)**
Expression of *kinA* and accumulation of sigma H at the onset of sporulation in *Bacillus subtilis*.
J. Bacteriol. **177**: 6679-6683
- Beebe K. D., Shin J., Peng J., Chaudhury C., Khera J., Pei D. (2000)**
Substrate recognition through a PDZ domain in tail-specific protease.
Biochemistry **39**: 3149-3155
- Begg K.J., Tomoyasu T., Donachie W.D., Khattar M., Niki H., Yamanaka K., Hiraga S., Ogura T. (1992)**
Escherichia coli mutant Y16 is a double mutant carrying thermosensitive *ftsH* and *ftsI* mutations.
J. Bacteriol. **174**: 2416-2417
- Ben-Yehuda S., Losick R. (2002)**
Asymmetric cell division in *Bacillus subtilis* involves a spiral-like intermediate of the cytokinetic protein FtsZ.
Cell **109**: 257-266
- Ben-Yehuda S., Rudner D.Z., Losick R. (2003)**
Assembly of the SpoIIIE DNA translocase depends on chromosome trapping in *Bacillus subtilis*.
Curr. Biol. **13**: 2196-2200
- Beyer A. (1997)**
Sequence analysis of the AAA protein family.
Protein Science **6**: 2043-2058
- Birnboim H., Doly J. (1979)**
A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.
Nucleic Acids Res. **7**: 1513-1523
- Blaszczak A., Georgopoulos C., Liberek K. (1999)**
On the mechanism of FtsH-dependent degradation of the σ^{32} transcriptional regulator of *Escherichia coli* and the role of DnaK chaperone machine.
Mol. Microbiol. **31**: 157-166
- Bradford M. M. (1976)**
A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding
Anal. Biochem. **72**: 248-254

Burnette, W.N. (1981)

„Western Blotting“ electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl polyacrylamid gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody protein A.

Anal. Biochem. **112**: 195-203

Chiba S., Akiyama Y., Ito K. (2002)

Membrane protein degradation by FtsH can be initiated from either end.

J. Bacteriol. **184**: 4775-4782

Cohen S., Chang A., Hsu L. (1972)

Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **69**: 2110-2114

Confalonieri F., Duguet M. (1995)

A 200 amino acid ATPase module in search for a basic function.

Bio. Essays **173**: 639-650

Cutting S., Driks A., Schmidt R., Kunkel B., Losick R. (1991)

Forespore-specific transcription of a gene in the signal transduction pathway that governs pro- σ^K processing in *Bacillus subtilis*.

Genes Dev. **5**: 456-466

Cutting S., Oke A., Driks A., Losick R., Lu S., Kroos L. (1990)

A forespore checkpoint for mother cell gene expression during development in *Bacillus subtilis*.

Cell **62**: 239-250

Cutting S., Anderson M., Lysenko E., Page A., Tomoyasu T., Tatematsu K., Tatsuta T., Kroos L., Ogura T. (1997)

SpoVM, a small protein essential to development in *Bacillus subtilis*, interacts with the ATP-dependent protease FtsH.

J. Bacteriol. **179**: 5534-5542

Cutting S., Roels S., Losick R. (1991)

Sporulation operon *spoIVFB* and the characterisation of mutations that uncouple mother-cell from forespore gene expression in *Bacillus subtilis*.

J. Mol. Biol. **221**: 1237-1256

Deuerling E. (1995)

Identifizierung und Analyse des *ftsH*-Gens, einem neuen allgemeinen Stressgen von *Bacillus subtilis*.

Dissertation, Universität Bayreuth

Deuerling E., Paeslack B., Schumann W. (1995)

The *ftsH*-gene of *Bacillus subtilis* is transiently induced after osmotic and temperature upshift.

J. Bacteriol. **177**: 4105-4112

Deuerling E., Mogg A., Richter C., Purucker M.W. (1997)

The *ftsH*-gene of *Bacillus subtilis* is involved in major cellular processes such as sporulation, stress adaptation and secretion.

Mol. Microbiol. **23**: 921-933

Dong T.C., Cutting S.M. (2003)

SpoIVB-mediated cleavage of SpoIVFA could provide the intercellular signal to activate processing of Pro-sigmaK in *Bacillus subtilis*.

Mol. Microbiol. **49**: 1425-1434

Fujita M., Sadaie Y. (1998)

Rapid isolation of RNA polymerase from sporulating cells of *Bacillus subtilis*.

Gene **221**: 185-190

Fujita M., Losick R. (2003)

The master regulator for entry into sporulation in *Bacillus subtilis* becomes a cell-specific transcription factor after asymmetric division.

Genes Dev. **17**: 1166-1174

Gamer J., Bujard H., Bukau B. (1992)

Physical interactions between heat shock proteins DnaK, DnaJ, and GrpE and the bacterial heat shock transcription factor σ^{32} .

Cell **69**: 833-842

Geisler U., Schumann W. (1993)

Isolation of stress mutants of *Bacillus subtilis* by a novel genetic method.

FEMS Microbiol. Lett. **108**: 251-254

Goldberg A.L. (1992)

The mechanism and functions of ATP-dependent proteases in bacterial and animal cells.

Eur. J. Biochem. **203**: 9-23

Gottesman S., Clark W.P., de Crecy-Lagard V., Maurizi M.R. (1993)

ClpX, an alternative subunit for the ATP-dependent Clp protease of *Escherichia coli*.

Sequence and in vivo activities.

J. Biol. Chem. **268**: 22618-22626

Granger L., O'Hara E., Wang R., Meffen F., Armstrong K., Yancey S., Babitzke P., Kushner S. (1998)

The *Escherichia coli mrsC* gene is required for cell growth and mRNA decay.

J. Bacteriol. **180**: 1920-1928

Green D. H., Cutting S. M. (2000)

Membrane topology of the *Bacillus subtilis* Pro- σ^K processing complex.

J. Bacteriol. **182**: 278-285

Grossman AD. (1995)

Genetic networks controlling the initiation of sporulation and the development of genetic competence in *Bacillus subtilis*.

Annu. Rev. Genet. **29**: 477-508

Ehrmann M., Boyd D., Beckwith J. (1990)

Genetic analysis of membrane protein topology by a sandwich gene fusion approach.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **87**: 7574-7578

Haas H., Becker W. M., Maasch H. J., Schlaak M. (1986)

Analysis of allergen components in grass pollen extracts using immunoblotting.
Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. **79**: 434-440

Harfst E. (1999)

Diplomarbeit, Konstruktion und Charakterisierung von Punkt-Mutationen im ATPase- und Zinkbindungs-Motiv des *Bacillus subtilis* *ftsH*-Gens
Diplomarbeit, Universität Bayreuth

Harwood C. R. (1989)

Biotechnology handbooks 2: *Bacillus subtilis*
Plenum Press **2**: 171-179

Harwood A.J., Shervington A., Bostock C.J. (1990)

Construction of a *neo* fusion gene for expression in both prokaryotic and eukaryotic cells.
Gene **88**: 279-283

Healy J., Weir J., Smith I., Losick R. (1991)

Post-transcriptional control of a sporulation regulatory gene encoding transcription factor sigma H in *Bacillus subtilis*.
Mol. Microbiol. **5**: 477-487

Hecker M. (2003)

A proteomic view of cell physiology of *Bacillus subtilis*-bringing the genome sequence to life.
Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. **83**: 57-92

Herman Ch., Ogura T., Tomoyasu T., Hiraga S., Akiyama Y., Ito K., Thomas R., Boulloc G., D'Ari R. (1993)

Cell growth and λ phage development controlled on by the same essential *Escherichia coli* gene *ftsH/hflB*.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **90**: 10861-10865

Herman Ch., Lecat S., Boulloc P., D'Ari R. (1995a)

Regulation of heat shock response depends on divalent metal ion in *hflB* mutant of *Escherichia coli*.
Mol. Microbiol. **18**: 247-255

Herman Ch., Thevenent D., D'Ari R., Boulloc P. (1995b)

Degradation of σ^{32} , the heat-shock regulator in *Escherichia coli*, is governed by HflB.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **92**: 3516-3520

Herman Ch., Thevenent D., D'Ari R., Boulloc P. (1997)

The HflB protease of *Escherichia coli* degrades its inhibitor λ cIII.
J. Bacteriol. **179**: 358-363

- Hermann C., Thevenet D., Boulloc P., Walker G.C., D'Ari R. (1998)**
Degradation of carboxy-terminal-tagged cytoplasmic proteins by the *Escherichia coli* protease HflB (FtsH).
Genes Dev. **12**: 1348-1355
- Herman C., Prakash S., Lu C.Z., Matouscheck A., Gross C.A. (2003)**
Lack of a robust unfoldase activity confers a unique level of substrate specificity to the universal AAA protease FtsH.
Mol. Cell. **11**: 659-669
- Hess S.M., Chasin M., Free C.A., Harris D.N. (1975)**
Modulators of cyclic AMP systems.
Adv. Biochem. Psychopharmacol. **14**:153-167
- Hoa T., Brannigan J. A., Ngo T., Cutting S. M. (2002)**
The *Bacillus subtilis* signal protein SpoIVB defines a new family of serine proteases.
J. Bacteriol. **184**: 191-199
- Hoch J.A. (1993)**
Regulation of the onset of the stationary phase and sporulation in *Bacillus subtilis*.
Adv. Microb. Physiol. **35**: 111-133
- Hoch J.A. (2000)**
Two-component and phosphorelay signal transduction.
Curr. Opin. Microbiol. **3**: 165-170
- Holmes D. W., Quickley M. (1981)**
A rapid boiling method for preparation of bacterial plasmids.
Anal. Biochem. **114**: 193-197
- Hopp T. P., Prickett K. S., Price V. L., Libby R. T., March C. J., Ceretti D. P., Urdal D. L., Conlon P.J. (1988)**
A short polypeptide marker sequence useful for recombination protein identification and purification.
Biol. Technol. **6**: 1204-1210
- Homuth G. (1997)**
Transkriptionsanalyse des *dnaK*-Locus von *Bacillus subtilis*.
Dissertation, Universität Bayreuth
- Homuth G., Masuda S., Mogk A., Kobayashi Y., Schumann W. (1997)**
The *dnaK* operon of *Bacillus subtilis* is heptacistronic.
J. Bacteriol. **179**: 1153-1164
- Inagawa T., Kato J., Niki H., Karata K., Ogura T. (2001)**
Defective plasmid partition in *ftsH* mutants of *Escherichia coli*.
Mol. Genet. Genomics. **265**: 755-762

Ireton K., Rudner D.Z., Siranosian K.J., Grossman A.D. (1993)

Integration of multiple developmental signals in *Bacillus subtilis* through the Spo0A transcription factor.

Genes Dev. **7**: 283-294

Jekle A. (1997)

Diplomarbeit, Regulation des *ftsH*-Gens von *Bacillus subtilis* und Charakterisierung einer *ftsH*-Nullmutante.

Lehrstuhl Genetik, Universität Bayreuth

Kaltwasser M., Wiegert T., Schumann W. (2002)

Construction and application of epitope- and green fluorescent protein-tagging Integrating vectors for *Bacillus subtilis*.

Appl. Environ. Microbiol. **68**: 2624-2628

Karata K., Inagawa T., Wilkinson A.J., Tatsuta T., Ogura T. (1999)

Dissecting the role of a conserved motif (the second region of homology) in the AAA family of ATPases. Site-directed mutagenesis of the ATP-dependent protease FtsH.

J. Biol. Chem. **274**: 26225-26232

Kihara A., Akiyama Y., Ito K. (1995)

FtsH is required for proteolytic elimination of uncomplexed forms of SecY, an essential protein translocase subunit.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **92**: 4532-4536

Kihara A., Akiyama Y., Ito K. (1996)

A protease complex in the *Escherichia coli* plasma membrane: HflKC (HflA) forms a complex with FtsH (HflB), regulating its proteolytic activity against SecY.

EMBO J. **15**: 6122-6131

Kihara A., Akiyama Y., Ito K. (1997)

Host regulation of lysogenic decision in bacteriophage λ : Transmembrane modulation of FtsH (HflB), the cII degrading protease, by HflKC (HflA).

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94**: 5544-5549

Kihara A., Akiyama Y., Ito K. (1998)

Different pathways for protein degradation by the FtsH/HflKC membrane embedded protease complex: an implication from the interference by a mutant form of a new substrate protein, YccA.

J. Mol. Biol. **279**: 175-188

Kim L., Mogk A., Schumann W. (1999)

A xylose-inducible *Bacillus subtilis* integration vector and its application.

Gene **181**: 71-76

Krauss G. (1997)

Biochemie der Regulation und Signaltransduktion.

Wiley-VCH, Weinheim, p113-121, p378-381

Kroos L., Nicco Yu Y. T. (2000)

Regulation of σ factor activity during *Bacillus subtilis* development.
Curr. Opin. Microbiol. **3**: 553-560

Kroos L., Nicco Yu Y.T., Mills D., Ferguson Miller S. (2002)

Forespore signaling is necessary for Pro- σ^K processing during *Bacillus subtilis* sporulation despite the loss of SpoIVFA upon translational arrest.
J. Bacteriol. **184**: 5393-5401

Krzywda S., Brzozowski A., Verma C., Ogura T. (2002)

The crystal structure of the AAA domain of the ATP-dependent protease FtsH of *Escherichia coli* at 1,5 Å resolution.
Structure **10**: 1073-1083

Kunau W.H., Beyer A., Franken T., Gotte K., Marzioch M., Saidowsky J., Skaletz-Rorowski A., Wiebel F.F. (1993)

Two complementary approaches to study peroxisome biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: forward and reversed genetics.
Biochimie **75**: 209-224

Kunst F., Ogasawara N., Moszer I., Albertini A. M., Alloni G., Azevedo V., et al. (1997)

The complete genome sequence of the Gram-positiv bacterium *Bacillus subtilis*
Nature **390**: 249-256

Laemmli U.K. (1970)

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature **227**: 689-695

Larsen C.N., Finley D. (1997)

Protein translocation channels in the proteasome and other proteases.
Cell **91**: 431-434

Leary J.J., Brigati D.J., Ward D.C. (1983)

Rapid and sensitive colorimetric method for visualizing biotin-labeled DNA probes hybridised to DNA or RNA immobilized on nitrocellulose: Bio-blot.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **80**: 4045-4049

Leffers G.G. Jr., Gottesman S. (1998)

Lambda Xis degradation *in vivo* by Lon and FtsH.
J. Bacteriol. **180**: 1573-1577

Leonhard K., Stiegler A., Neupert W., Langer T. (1999)

Chaperone-like activity of the AAA domain of the yeast Yme1 AAA protease.
Nature **398**: 348-351

Levin P.A., Losick R. (1996)

Transcription factor Spo0A switches the localization of the cell division protein FtsZ from a medial to a bipolar pattern in *Bacillus subtilis*.
Genes Dev. **10**: 478-488

Lill R., Dowhan W., Wickner W. (1990)

The ATPase activity of SecA is regulated by acidic phospholipids, SecY, and the leader and mature domains of precursor proteins.
Cell **60**: 271-280

Liu J., Cosby W.M., Zuber P. (1999)

Role of Lon and ClpX in the post-translational regulation of sigma subunit of RNA polymerase required for cellular differentiation in *Bacillus subtilis*.
Mol. Microbiol. **33**: 415-428

Lopez P., Perez Urena M.T., Espinosa M. (1981)

The effect of magnesium of transfection and transformation in *Bacillus subtilis*.
Can. J. Microbiol. **27**: 991-997

Lysenko E., Ogura T., Cutting S. (1997)

Characterisation of the *ftsH*-gene of *Bacillus subtilis*.
Microbiol. **143**: 971-978

Makyio H., Niwa H., Motohashi K., Taguchi H., Yoshida M. (2002)

Stabilization of FtsH-unfolded protein complex by binding of ATP and blocking of protease.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **296**: 8-12

Matsuzawa H., Ushiyama S., Koyama Y., Ohata T. (1984)

Escherichia coli K-12 *tolZ* mutants tolerant to colicins E2, E3, D, Ia, and Ib: defect on generation of the electrochemical proton gradient.
J. Bacteriol. **160**: 733-739

Mercer K. L. N., Weiss D. S. (2002)

The *Escherichia coli* cell division protein FtsW is required to recruit its cognate transpeptidase, FtsI (PBP3), to the division site.
J. Bacteriol. **184**: 904-912

Moller W., Amons R. (1985)

Phosphate-binding sequences in nucleotide-binding proteins.
FEBS Lett. **186**: 1-7

Nakano M.M., Dailly Y.P., Zuber P., Clark D.P. (1997)

Characterization of anaerobic fermentative growth of *Bacillus subtilis*: identification of fermentation end products and genes required for growth.
J. Bacteriol. **179**: 6749-6755

Neuwald A.F., Aravind L., Spouge J.L., Koonin E.V. (1999)

AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes.
Genome Res. **9**: 27-43

- Niwa H., Tsuchiya D., Masasuke Y., Makyio H., Morikawa V. (2002)**
Hexameric ring structure of the ATPase domain of the membrane-integrated Metalloprotease FtsH from *thermos thermophilus* HB8
Structure **10**: 1415-1423
- Ogasawara N., Nakai S., Yoshikawa H. (1994)**
Systematic sequencing of the 180 kilobase region of the *Bacillus subtilis* chromosome containing the replication origin.
DNA Res. **1**: 1-14
- Ogura T., Tomoyaso T., Yuki T., Morimura S., Begg K., Donachie W., Mori H., Nik H., Hirag S. (1991)**
Structure and function of the *ftsH*-gene in *Escherichia coli*.
Res. Microbiol. **142**: 279-282
- Ogura T., Inoue K., Tatsuta T., Suzaki T., Karat K., Young K., Su L., Fierke C.A., Jackman J.E., Raetz C.R.H., Coleman J., Tomoyasu T., Matsuzawa H. (1999)**
Balanced biosynthesis of major membrane components through regulated degradation of the committed enzyme of lipid A biosynthesis by the AAA protease FtsH (HflB) in *Escherichia coli*.
Mol. Microbiol. **31**: 833-844
- Ogura T., Wilkinson A.J. (2001)**
AAA+ superfamily ATPases: common structure-diverse function.
Genes Cells. **6**: 575-597
- Oppenheim A., Teff D., Koby S., Shotland Y., Ogura T. (2000)**
A colicin-tolerant *Escherichia coli* mutant confers HflB phenotype carries two mutations in the region coding for the C-terminal domain of FtsH (HflB).
FEMS **183**: 115-117
- Pallen M. J., Ponting C. P. (1997)**
PDZ domains in bacterial proteins.
Mol. Microbiol. **26**: 411-415
- Perego M. (1997)**
A peptide export-import control circuit modulating bacterial development regulates protein phosphatases of the phosphorelay.
Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. **94**: 8612-8617
- Perego M., Hoch J. A. (2002)**
Two-component systems, phosphorelays, and regulation of their activities by phosphatases.
Genes to Cells **7**: 473-481
- Piggot P. J., Losick R. (2002)**
Sporulation genes and intercompartmental regulation.
Genes to Cells **7**: 483-518

Pogliano J., Sharp M.D., Pogliano K. (2002)

Partitioning of chromosomal DNA during establishment of cellular asymmetry in *Bacillus subtilis*.

J. Bacteriol. **184**: 1743-1749.

Ponting C. P. (1997)

Evidence for PDZ domains in bacteria, yeast, and plants.

Protein Sci. **6**: 464-468

Ponting C. P., Phillips C., Davies K. E., Blake D. J. (1997)

PDZ domains: targeting signalling molecules to sub-membranous sites.

Bio. Essays **19**: 469-479

Prajapati R.S., Ogura T., Cutting S.M. (2000)

Structural and functional studies on an FtsH inhibitor from *Bacillus subtilis*.

Biochem. Biophys. Acta. **1475**: 353-359

Predich M., Nair G., Smith I. (1992)

Early *spo* gene expression in *Bacillus subtilis*: the role of interrelated signal transduction systems.

Biochimie **74**: 669-678

Purucker (1996)

Das *ftsH*-Gen von *Bacillus subtilis* ist semi-essentiell.

Diplomarbeit, Universität Bayreuth

Resnekov O. (1999)

Role of Sporulation Protein BofA in Regulation Activation of the *Bacillus subtilis*

Developmental Transcription Factor σ^K .

J. Bacteriol. **181**: 5384-5388

Ricca E., Cutting S., Losick R. (1992)

Characterisation of *bofA*, a Gene Involved in Intercompartmental Regulation of Pro- σ^K

Processing during Sporulation in *Bacillus subtilis*.

J. Bacteriol. **174**: 3177-3184

Rudner D. Z., Losick R. (2002)

A sporulation membrane protein tethers the Pro- σ^K processing enzyme to its inhibitor and dictates its subcellular localisation.

Genes Develop. **16**: 1007-1018

Saito H., Shibata T., Ando T. (1979)

Mapping of genes determining non-permissiveness and host-specific restriction to bacteriophages in *Bacillus subtilis*.

Mol. Gen. Genet. **170**: 117-122

Sancar A., Hearst JE. (1993)

Molecular matchmakers.

Science **259**: 1415-1420

Santos D., Almeida D. (1975)

Isolation and characterisation of a new temperature sensitive cell division mutant of *Escherichia coli* K12.
J. Bacteriol. **124**: 1502-1507

Sambrook, Russel (2001)

Molecular cloning
Cold Spring Harbour Press, Cold Spring Harbour, New York

Schneider S., Buchert M., Georgiev O., Catimel B., Halford M., Stacker S. A., Baechli T., Moelling K., Hovens C. M. (1999)

Mutagenesis and selection of PDZ domains that bind new protein targets.
Natl. Biotechnol. **17**: 170-175

Schumann W. (1999)

FtsH-a single chain charonin ?
FEMS Microbiol. Rev. **23**: 1-11

Seyffert W., Gassen H. G., Hess O., Jäckle H., Fischbach K. F. (1998)

Lehrbuch der Genetik
Gustav Fischer Verlag **1**: 260-261

Shotland Y., Koby S., Teff D., Mansur N., Oren D., Tatamatsu K., Tomoyasu T., Kessel M., Bukau B., Ogura T., Oppenheim A. (1997)

Proteolysis of the phage λ CII regulatory protein by FtsH (HflB) of *Escherichia coli*.
Mol. Microbiol. **24**: 1303-1310

Shotland Y., Teff D., Koby S., Kobiler O., Oppenheim A.B. (2000)

Characterization of a conserved alpha-helical, coiled-coil motif at the C-terminal domain of the ATP-dependent FtsH (HflB) protease of *Escherichia coli*.
J. Mol. Biol. **299**: 953-964.

Smith D.B., Johnson K.S. (1988)

Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusion with glutathion-S-transferase.
Gene **67**: 31-40

Smith G. L., Socransky S. S., Smith C. M. (1989)

Rapid method for the purification of DNA from subgingival microorganisms.
Oral. Microbiol. Immunol. **4**: 47-51

Southern E.M. (1975)

Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis.
J. Mol. Biol. **98**: 503-517

Sprenger H., Konrad L., Rischkowsky E., Gemsa D. (1995)

Background reduction in northern analysis by preabsorption of digoxigenin-labeled riboprobes.
Biotechniques. **19**: 334-336, 338-340

Strauch M.A., Perego M., Burbulys D., Hoch J.A. (1989)

The transition state transcription regulator AbrB of *Bacillus subtilis* is autoregulated during vegetative growth.

Mol. Microbiol. **3**: 1203-1209

Strauch M.A., Wu J.J., Jonas R.H., Hoch J.A. (1993)

A positive feedback loop controls transcription of the *spoOF* gene, a component of the sporulation phosphorelay in *Bacillus subtilis*.

Mol. Microbiol. **7**: 967-974

Strauch M.A. (1995)

Delineation of AbrB-Binding Sites on the *B. subtilis* *spo0H*, *kinB*, *ftsAZ*, and *pbpE* Promoters and Use of a Derived Homology To Identity a Previously Unsuspected Binding Site in the *bsuBI* Methylase promoter.

J. Bacteriol. **177**: 6999-7002

Stragier P., Losick R. (1996)

Molecular genetics of sporulation in *Bacillus subtilis*.

Annu. Rev. Genet. **30**: 297-341

Stryer, L. (1990)

Biochemie

Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg

Suzuki C. K., Rep M., van Dijl J. M., Suda K., Grivell L. A., Schatz G. (1997)

ATP-dependent proteases that also chaperone protein biogenesis

TIBS **22**

Tatsuta T., Tomoyasu T., Bukau B., Kitagawa M., Mori H., Karata K., Ogura T. (1998)

Heat shock regulation in the *ftsH* null mutant of *Escherichia coli*: Dissection of stability and activity control mechanism of σ^{32} *in vivo*.

Mol. Microbiol. **30**: 583-593

Tauer R., Mannhaupt G., Schnall R., Pajic A., Langer T., Feldmann H. (1994)

Yta10p is required for the ATP-dependent degradation of polypeptides in the inner membrane of mitochondria.

FEBS Lett. **353**: 201-206

Teff D., Koby S., Shotland Y., Ogura T., Oppenheim A. (2000)

A colicin-tolerant *Escherichia coli* mutant that confers Hfl phenotype carries two Mutations in the region coding for the C-terminal domain of FtsH (HflB).

FEMS Microbiol. Lett. **183**: 115-117

Tilly K., Spence J., Georgopoulos C. (1989)

Modulation of stability of the *Escherichia coli* heat shock regulatory σ^{32} .

J. Bacteriol. **171**: 1585-1589

Tomoyasu T., Yamanaka K., Murat K., Zuzaki T., Boulloc P., Kato A., Hiraga S., Ogura T. (1993a)

Topology and subcellular localisation of FtsH-Protein in *Escherichia coli*.
J. Bacteriol. **175**: 1352-1357

Tomoyasu T., Yuki T., Yamanaka K., Morimura S., Mori H., Niki H., Hiraga S., Ogura T. (1993b)

The *Escherichia coli* FtsH-protein is a procaryotic member of a protein family of putative ATPases involved in membrane functions, cell cycle control, and gene expression.
J. Bacteriol. **175**: 1344-1351

Tomoyasu T., Gamer J., Kanemor M., Rutman A., Oppenheim A., Yura T., Yamanaka K., Morimura S., Mori H., Niki H., Hiraga S., Ogura T. (1995)

Escherichia coli FtsH is a membrane-bound, ATP-dependent protease which degrades the heat-shock transcription factor σ^{32} .
EMBO J. **14**: 2551-2560

Tomoyasu T., Ogura T., Tatsuta T., Bukau B. (1998)

Levels of DnaK and DnaJ provide tight control of heat shock gene expression and protein repair in *Escherichia coli*.
Mol. Microbiol. **30**: 567-581

Towbin H., Stanheim T., Gordon J. (1979)

Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamidgels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **87**: 4350-4356

Turgay K., Hamoen L.W., Venema G., Dubnau D. (1997)

Biochemical characterization of a molecular switch involving the heat shock protein ClpC, which controls the activity of ComK, the competence transcription factor of *Bacillus subtilis*.
Genes Dev. **11**: 119-128

Valle F., Ferrari E. ((1998)

Subtilisin: a redundantly temporally regulated gene?
In *Regulation of Procaryotic Development*: 131-146

Veenendal A., van der Does C., Driessen A. J. M. (2002)

The core of the bacterial translocase harbors a tilted transmembrane segment3 of SecE.
J. Biol. Chem. **277**: 36640-36645

Veenendal A., van der Does C., Driessen A. J. M. (2001)

Mapping the sites of interaction between SecY and SecE by cysteine scanning mutagenesis.
J. Biol. Chem. **276**: 32559-32466

Volker U., Engelmann S., Maul B., Riethdorf S., Volker A., Schmid R., Mach H., Hecker M. (1994)

Analysis of the induction of general stress proteins of *Bacillus subtilis*.
Microbiology. **140**: 741-752

- Wakeley P., Dorazi R., Hoa T., Bowyer J. R., Cutting S. M. (2000)**
Proteolysis of SpoIVB is a critical determinant in signalling of pro- σ^K processing in *Bacillus subtilis*.
Mol. Microbiol. **36**: 1336-1348
- Wehrl W., Niederweis M., Schumann W. (2000)**
The FtsH Protein Accumulates at the Septum of *Bacillus subtilis* during Cell Division and Sporulation.
J. Bacteriol. **182**: 3870-3873
- Wehrl W. (1999)**
Funktionelle Analyse des *Bacillus subtilis* *ftsH*-Gens.
Diplomarbeit, Universität Bayreuth
- Wickner S., Hoskins J., McKenney K. (1991)**
Function of DnaJ and DnaK as chaperones in origin-specific DNA binding by RepA.
Nature **350**: 165-167
- Wiegert T., Homuth G., Versteeg S., Schumann W. (2001)**
Alkaline shock induces the *Bacillus subtilis* σ^W regulon.
Mol. Microbiol. **41**: 59-71
- Wittmann M. (1999)**
Identifizierung eines zusätzlichen Kontrollpunkts für FtsH bei der Sporulation von *Bacillus subtilis*.
Diplomarbeit, Universität Bayreuth
- Yanish-Perron C., Viera J., Messing J. (1985)**
Improved phage M13 cloning vectors and host strains: nucleotide sequence of M13mp18 and pUC19 vectors.
Gene **33**: 103-119
- Young K., Silver L., Bramhill D., Cameron P., Eveland S.S., Raetz C.R.H., Hylan S.A., Anderson M.S. (1995)**
The *envA* permeability/cell division gene of *Escherichia coli* encodes the second enzyme of lipid A biosynthesis.
J. Bacteriol. **270**: 30384-30391
- Zellmeier S. (2001)**
Interaktion zwischen PBP4 und FtsH von *Bacillus subtilis* *in vivo* und *in vitro*.
Diplomarbeit, Universität Bayreuth
- Zellmeier S., Zuber U., Schumann W., Wiegert T. (2003)**
The absence of FtsH metalloprotease activity causes overexpression of the sigmaW-controlled *pbpE* gene, resulting in filamentous growth of *Bacillus subtilis*.
J. Bacteriol. **185**: 973-982.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst, und keine anderen ,
als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Ferner erkläre ich, dass ich weder an der Universität Bayreuth, noch an einer andern
Hochschule, versucht habe, eine Dissertation einzureichen, oder mich einer
Promotionsprüfung zu unterziehen.

Bayreuth, April 2004

Matthias Kotschwar